

Etude enzymatique et thermodynamique de l'hydrolyse de phospho-monoesters et de phospho-diesters de quelques nucléotides

Thèse

présentée à la Faculté des sciences
de l'Université de Genève
pour obtenir le grade de docteur ès sciences chimiques

par

Alain PETER

d'Aubonne et Vevey (Vaud)

Thèse No 1679

1974
—

Etude enzymatique et thermodynamique de l'hydrolyse de phospho-monoesters et de phospho-diesters de quelques nucléotides

Thèse

présentée à la Faculté des sciences
de l'Université de Genève
pour obtenir le grade de docteur ès sciences chimiques

par

Alain PETER
d'Aubonne et Vevey (Vaud)

Thèse N° 1679

La Faculté des sciences, sur le préavis de Messieurs Th. Posternak, directeur de thèse et professeur honoraire, D. Janjic, directeur de thèse et professeur ordinaire et E. Charollais, professeur assistant, autorise l'impression de la présente thèse, sans exprimer d'opinion sur les propositions qui y sont énoncées.

Genève, le 27 septembre 1974.

Le doyen :
Jean Muller



Thèse N° 1679.

A la mémoire de mon père

Digitized by the Internet Archive
in 2026

Ce travail, pourtant modeste, n'aurait pas vu le jour sans le précieux dévouement de mes deux maîtres, le Professeur Théodore Posternak et le Professeur Désimir Janjic.

Chacun saura trouver, dans ces quelques mots, l'assurance de ma respectueuse affection.

Je dis mes très vifs remerciements au Docteur Etienne Charollais qui m'a constamment mis au bénéfice de sa vaste expérience.

Ma reconnaissance s'adresse également au Docteur Jacques Buffle pour ses conseils pertinents lors de la détermination des pK, à Mademoiselle Françoise Michel pour son aide efficace en calcul statistique et à Monsieur Bernard Balser pour ses mesures calorimétriques.

Un hommage très particulier, enfin, à mes proches et spécialement à ma femme dont on sait la part scientifique qu'elle a prise dans la réalisation de cette thèse.

TABLL DES MATIERES

	AVANT-PROPOS	1
1.	Historique	2
1.1.	Découverte du cAMP - Son importance	2
1.2.	Le cAMP et ses dérivés	3
1.2.1.	Le cAMP	3
1.2.2.	Dérivés	5
1.3.	Les expériences de Greengard	6
2.	Nucléotides cycliques	12
2.1.	Extraction et préparation de la phospho- diestérase	12
2.1.1.	Généralités	12
2.1.2.	Propriétés de la PDE	12
2.1.2.1.	pH optimum	12
2.1.2.2.	Inhibiteurs	12
2.1.2.3.	Activateurs	12
2.1.2.4.	Isoenzymes	13
2.1.2.5.	Activité en fonction de la température	13
2.1.2.6.	Spécificité vis-à-vis de différents substrats	13
2.2.	Recherche de la PDE	15
2.2.1.	Méthodes et préparation	15
2.2.1.1.	Préparation de la PDE du cerveau de rat	15
2.2.1.2.	Dosage des nucléotides hydrolysés	16
2.2.2.	Tests préliminaires	17
2.2.3.	Sur les divers ferments utilisés	18
2.2.4.	Concentration des ferments	20
2.2.4.1.	Dialyse	20
2.2.4.2.	Lyophilisation	21
2.2.4.2.1.	Principe de la méthode	21
2.2.4.2.2.	Mode opératoire	21
2.2.4.2.3.	Ferment concentré (Rats Wistar-Carouge)	21
2.2.4.2.4.	Ferment concentré (Rats Wistar-Sabourdy)	23
2.2.4.3.	Commentaires	25
2.3.	Les cinétiques d'hydrolyse	26
2.3.1.	Considérations générales	26
2.3.2.	Résultats	28
2.4.	Les substrats testés au calorimètre	29

2.4.1.	Dérivés de la purine	30
2.4.2.	Dérivés de la pyrimidine	32
2.4.3.	Synthèses	33
2.4.3.1.	cIMP	33
2.4.3.2.	N-1-oxyde-cAMP	33
2.5.	Etude calorimétrique	35
2.5.1.	Généralités	35
2.5.2.	Le microcalorimètre de Wadsö	36
2.5.2.1.	Principe de fonctionnement	36
2.5.2.2.	Caractéristiques techniques	37
2.5.2.2.1.	Conditions de travail	37
2.5.2.2.2.	Sensibilité	38
2.5.2.2.3.	Cellules - Calibrage - Enregistrement du signal	38
2.5.2.2.4.	Précision des seringues	39
2.5.3.	Mesure des enthalpies de réaction	40
2.5.3.1.	Exemple détaillé : Hydrolyse IV du cTMP	40
2.5.3.1.1.	Préparation des réactifs	40
2.5.3.1.2.	Séquence des opérations-mesure	40
2.5.3.1.3.	Commentaires	41
2.5.3.1.4.	Dépouillement de l'enthalpogramme	41
2.5.3.2.	Résultats	42
2.5.3.3.	Analyse de variance simple	47
2.6.	Phénomènes parasites	48
2.6.1.	Généralités	48
2.6.2.	Les chaleurs de protonation	49
2.6.2.1.	Nature de la protonation	49
2.6.2.2.	Les solutions de Sturtevant, Westheimer et Greengard	50
2.6.2.2.1.	Greengard et Sturtevant	50
2.6.2.2.2.	Sturtevant	51
2.6.2.2.3.	Westheimer et Sturtevant	52
2.6.2.3.	Méthode personnelle	52
2.6.2.3.1.	Détermination des pK	53
2.6.2.3.2.	Mesures calorimétriques de la protonation	58
2.6.3.	Les enthalpies de mélange	59
2.6.3.1.	Nucléotides cycliques	60
2.6.3.2.	Les nucléotides non cycliques	63
2.6.4.	Corrections définitives (chaleurs de protonation)	64

2.6.5.	Résultats définitifs	66
3.	5'-Nucléotides	67
3.1.	La 5'-nucléotidase	67
3.1.1.	Propriétés générales	67
3.1.2.	Tests préliminaires	68
3.1.2.1.	Résistance à la thermostatisation	68
3.1.2.1.1.	Première expérience	68
3.1.2.1.2.	Seconde expérience	69
3.1.2.2.	Hydrolyse de 5 ⁴ AMP avec $ E $ variable	69
3.1.2.3.	Activité en fonction du pH	70
3.2.	Les cinétiques d'hydrolyse	72
3.2.1.	Conditions expérimentales	72
3.2.2.	Résultats et commentaires	72
3.3.	Les substrats	74
3.3.1.	Synthèses	74
3.3.2.	Les substrats testés au calorimètre	74
3.3.2.1.	Dérivés puriques	74
3.3.2.2.	Dérivé pyrimidique	74
3.4.	Etude calorimétrique	75
3.4.1.	Mode expérimental	75
3.4.2.	Résultats	75
3.4.3.	Analyse de variance simple	77
3.5.	Phénomènes parasites	78
3.5.1.	Chaleurs de protonation	78
3.5.1.1.	Calcul des enthalpies de protonation	79
3.5.1.2.	Détermination microcalorimétrique du ΔH protonation	81
3.5.2.	Les chaleurs de dilution	82
3.6.	Résultats définitifs	84
4.	Les 3'-nucléotides	85
4.1.	3'-nucléotidase	85
4.1.2.	Les cinétiques d'hydrolyse	85
4.1.3.	Concentration de l'enzyme	86
4.2.	Les substrats testés au calorimètre	88
4.3.	Mesure des enthalpies de réaction	89
4.4.	Corrections	90
4.4.1.	Chaleurs de protonation	90

4.4.2.	Chaleurs de dilution	90
4.5.	Résultats définitifs	91
5.	Discussion	92
5.1.	Comparaison avec les résultats de Greengard	92
5.2.	Influence de la structure des substrats	92
5.2.1.	Structure et vitesse d'hydrolyse	92
5.2.2.	Enthalpie et structure	93
5.2.3.	Conclusions	96
	Résumé	98
	Bibliographie	99

Abréviations

cAMP	acide adénosine 3', 5'-monophosphorique ou AMP cyclique
cGMP	acide guanosine 3',5'-monophosphorique
cIMP	inosine-3', 5'-monophosphate
cCMP	cytidine-3', 5'-monophosphate
cTMP	thymidine-3', 5'-monophosphate
cUMP	uridine-3', 5'-monophosphate
cXMP	xanthosine-3', 5'-monophosphate
2'-d-cAMP	2'-déoxy-AMP cyclique
2'-O-Bu-cIMP	2'-O-monobutyryl IMP cyclique
N-2-Bu-cGMP	N-2-monobutyryl GMP cyclique
6-Cl-Pu-rib-3'5'-P	6-chloropurine-riboside 3', 5'-phosphate
N-6-Bu-cAMP	N-6-monobutyryl AMP cyclique
N-6-Me-cAMP	N-6-monométhyl AMP cyclique
N-6-diMe-cAMP	N-6-diméthyl AMP cyclique
N-6-n-bu-cAMP	N-6-n-butyl AMP cyclique
N-6-t-bu-cAMP	N-6-t-butyl AMP cyclique
Di-Bu-cAMP	N-6,2'-O-dibutyryl AMP cyclique
8-NH ₂ -cAMP	8-amino AMP cyclique
8-Br-cAMP	8-bromo AMP cyclique
8-SH-cAMP	8-thio AMP cyclique
8-OH-cAMP	8-hydroxy-AMP cyclique
N ¹ -ox-cAMP	N ¹ -oxyde AMP cyclique
3'-AMP	acide adénosine 3'-monophosphorique
5'-AMP ou AMP	acide adénosine 5'-monophosphorique
ADP	acide adénosine diphosphorique
ATP	acide adénosine triphosphorique

Des abréviations analogues sont valables pour les autres nucléotides cycliques et non cycliques.

PDE	phosphodiesterase
PP _i	pyrophosphate inorganique
BSA	Bovine Serum Albumine
A	pics de l'intégrateur
LB	ligne de base
S	concentration de substrat
Δ	surface sur l'enthalpogramme

2.4.1.	Dérivés de la purine	30
2.4.2.	Dérivés de la pyrimidine	32
2.4.3.	Synthèses	33
2.4.3.1.	cIMP	33
2.4.3.2.	N-1-oxyde-cAMP	33
2.5.	Etude calorimétrique	35
2.5.1.	Généralités	35
2.5.2.	Le microcalorimètre de Wadsö	36
2.5.2.1.	Principe de fonctionnement	36
2.5.2.2.	Caractéristiques techniques	37
2.5.2.2.1.	Conditions de travail	37
2.5.2.2.2.	Sensibilité	38
2.5.2.2.3.	Cellules - Calibrage - Enregistrement du signal	38
2.5.2.2.4.	Précision des seringues	39
2.5.3.	Mesure des enthalpies de réaction	40
2.5.3.1.	Exemple détaillé : Hydrolyse IV du cTMP	40
2.5.3.1.1.	Préparation des réactifs	40
2.5.3.1.2.	Séquence des opérations-mesure	40
2.5.3.1.3.	Commentaires	41
2.5.3.1.4.	Dépouillement de l'enthalpogramme	41
2.5.3.2.	Résultats	42
2.5.3.3.	Analyse de variance simple	47
2.6.	Phénomènes parasites	48
2.6.1.	Généralités	48
2.6.2.	Les chaleurs de protonation	49
2.6.2.1.	Nature de la protonation	49
2.6.2.2.	Les solutions de Sturtevant, Westheimer, et Greengard	50
2.6.2.2.1.	Greengard et Sturtevant	50
2.6.2.2.2.	Sturtevant	51
2.6.2.2.3.	Westheimer et Sturtevant	52
2.6.2.3.	Méthode personnelle	52
2.6.2.3.1.	Détermination des pK	53
2.6.2.3.2.	Mesures calorimétriques de la protonation	58
2.6.3.	Les enthalpies de mélange	59
2.6.3.1.	Nucléotides cycliques	60
2.6.3.2.	Les nucléotides non cycliques	63
2.6.4.	Corrections définitives (chaleurs de protonation)	64

2.6.5.	Résultats définitifs	66
3.	5'-Nucléotides	67
3.1.	La 5'-nucléotidase	67
3.1.1.	Propriétés générales	67
3.1.2.	Tests préliminaires	68
3.1.2.1.	Résistance à la thermostatisation	68
3.1.2.1.1.	Première expérience	68
3.1.2.1.2.	Seconde expérience	69
3.1.2.2.	Hydrolyse de 5 ⁴ AMP avec $ E $ variable	69
3.1.2.3.	Activité en fonction du pH	70
3.2.	Les cinétiques d'hydrolyse	72
3.2.1.	Conditions expérimentales	72
3.2.2.	Résultats et commentaires	72
3.3.	Les substrats	74
3.3.1.	Synthèses	74
3.3.2.	Les substrats testés au calorimètre	74
3.3.2.1.	Dérivés puriques	74
3.3.2.2.	Dérivé pyrimidique	74
3.4.	Etude calorimétrique	75
3.4.1.	Mode expérimental	75
3.4.2.	Résultats	75
3.4.3.	Analyse de variance simple	77
3.5.	Phénomènes parasites	78
3.5.1.	Chaleurs de protonation	78
3.5.1.1.	Calcul des enthalpies de protonation	79
3.5.1.2.	Détermination microcalorimétrique du ΔH protonation	81
3.5.2.	Les chaleurs de dilution	82
3.6.	Résultats définitifs	84
4.	Les 3'-nucléotides	85
4.1.	3'-nucléotidase	85
4.1.2.	Les cinétiques d'hydrolyse	85
4.1.3.	Concentration de l'enzyme	86
4.2.	Les substrats testés au calorimètre	88
4.3.	Mesure des enthalpies de réaction	89
4.4.	Corrections	90
4.4.1.	Chaleurs de protonation	90

4.4.2.	Chaleurs de dilution	90
4.5.	Résultats définitifs	91
5.	Discussion	92
5.1.	Comparaison avec les résultats de Greengard	92
5.2.	Influence de la structure des substrats	92
5.2.1.	Structure et vitesse d'hydrolyse	92
5.2.2.	Enthalpie et structure	93
5.2.3.	Conclusions	96
	Résumé	98
	Bibliographie	99

Abréviations

cAMP	acide adénosine 3', 5'-monophosphorique ou AMP cyclique
cGMP	acide guanosine 3',5'-monophosphorique
cIMP	inosine-3', 5'-monophosphate
cCMP	cytidine-3', 5'-monophosphate
cTMP	thymidine-3', 5'-monophosphate
cUMP	uridine-3', 5'-monophosphate
cXMP	xanthosine-3', 5'-monophosphate
2'-d-cAMP	2'-déoxy-AMP cyclique
2'-O-Bu-cIMP	2'-O-monobutyryl IMP cyclique
N-2-Bu-cGMP	N-2-monobutyryl GMP cyclique
6-Cl-Pu-rib-3'5'-P	6-chloropurine-riboside 3', 5'-phosphate
N-6-Bu-cAMP	N-6-monobutyryl AMP cyclique
N-6-Me-cAMP	N-6-monométhyl AMP cyclique
N-6-diMe-cAMP	N-6-diméthyl AMP cyclique
N-6-n-bu-cAMP	N-6-n-butyl AMP cyclique
N-6-t-bu-cAMP	N-6-t-butyl AMP cyclique
Di-Bu-cAMP	N-6,2'-O-dibutyryl AMP cyclique
8-NH ₂ -cAMP	8-amino AMP cyclique
8-Br-cAMP	8-bromo AMP cyclique
8-SH-cAMP	8-thio AMP cyclique
8-OH-cAMP	8-hydroxy-AMP cyclique
N ¹ -ox-cAMP	N ¹ -oxyde AMP cyclique
3'-AMP	acide adénosine 3'-monophosphorique
5'-AMP ou AMP	acide adénosine 5'-monophosphorique
ADP	acide adénosine diphosphorique
ATP	acide adénosine triphosphorique

Des abréviations analogues sont valables pour les autres nucléotides cycliques et non cycliques.

PDE	phosphodiesterase
PP _i	pyrophosphate inorganique
BSA	Bovine Serum Albumine
λ	pics de l'intégrateur
LB	ligne de base
S	concentration de substrat
Δ	surface sur l'enthalpogramme

AVANT-PROPOS

Le but des travaux dont on a relaté l'essentiel dans les pages qui suivent, est axé tout entier sur la détermination de l'enthalpie résultant de quelques réactions enzymatiques.

Ces dernières consistent à hydrolyser des liaisons phosphomono- et-diester d'un certain nombre de nucléotides.

La première série de substrats est constituée par le cAMP et quelques-uns de ses dérivés.

La seconde série de produits concerne divers analogues de la famille du 5'-AMP tandis que dans un dernier jet, nous avons travaillé sur deux composés 3'-phosphorylés, le 3'-AMP et le 3'-GMP.

Après avoir survolé l'ensemble du sujet, ce qui sera notre premier point, nous étudierons dans l'ordre tous les problèmes afférents aux nucléotides cycliques, second point, avant de terminer par les 5'- et 3'-nucléotides.

De modestes conclusions et un bref résumé mettront un terme à ce mémoire.

1. HISTORIQUE

1.1. Découverte du cAMP - Son importance

C'est à Lipkin (10,11) et Sutherland (1,3,12) que revient le mérite d'avoir découvert l'acide adénosine 3', 5'-phosphorique (cAMP) et déterminé sa composition et sa structure. La reconnaissance du rôle physiologique du cAMP par Sutherland, assortie de son concept alors nouveau du second messager (2) ont été suivis par de nombreux travaux.

A titre d'exemple, nous citerons le rôle médiateur du cAMP dans l'effet hyperglycémique de l'épinephrine et du glucagon (1,3,4), son influence dans l'action de l'hormone thyroïdienne (TSH) sur la thyroïde (5,30), son rôle sur l'hormone corticotrope (6), sur l'hormone lutéotrope (7), sur la vasopressine (8), son effet dans l'action de l'hormone mélanotrope sur les chromatophores (9). Ces recherches ont décidément ouvert une voie féconde et provoqué une impulsion décisive quant à la connaissance des problèmes de transmission du message hormonal.

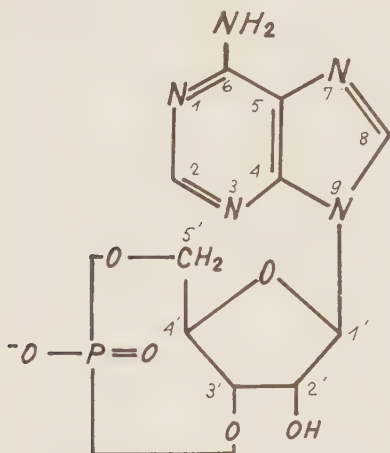
Alors que les endocrinologistes effectuaient des expériences diverses, les physico-chimistes et les chimistes de synthèse ne restaient pas inactifs. Tandis que ceux-ci synthétisaient un grand nombre de dérivés du composé initial pour les donner aux hormonologistes qui les testaient, ceux-là s'occupaient de l'étude structurale et thermodynamique du cAMP.

Après avoir parlé de la structure du cAMP, nous présenterons un résumé de ses différents dérivés non sans discuter de leur importance biologique. Le moment sera alors venu de mentionner les travaux thermodynamiques de Greengard et de ses collaborateurs lesquels sont le point de départ de nos propres recherches.

1.2. Le cAMP et ses dérivés

1.2.1. Le cAMP

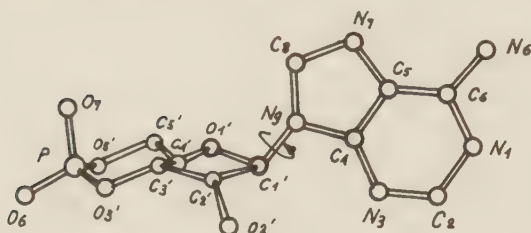
Il répond à la formule suivante :



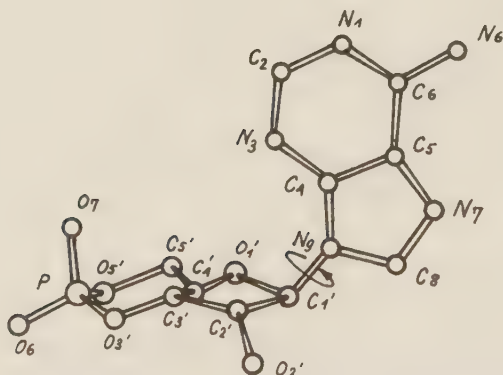
Nous voyons que le cAMP est composé d'une base (adénine), fixée par une liaison β -glycosidique au sucre (D-ribose), sur lequel le groupe phosphoryle, à la différence du 5'-AMP, métabolite connu, se trouve sous forme de diester ce qui produit un cycle de six atomes dont font partie les oxygènes O(5') et O(3').

La structure spatiale du cAMP a été magistralement démontrée par une savante étude de Watenpaugh (14) et coll. tandis que Coulter (15) a mené la même recherche sur le cUMP. Ces expériences font appel à un processus dérivé de la méthode de diffraction des rayons X de Laus. En bombardant un monocristal de cUMP par des radiations K α d'une cathode émettrice en cuivre, on absorbe et on mesure l'intensité des rayons qui sont diffractés selon une géométrie réglée par l'ordonnance des plans réticulaires de la matière. Le dépouillement des 2712 réflexions enregistrées dans une chambre tridimensionnelle exige le concours d'un puissant appareil mathématique. Avec des molécules relativement simples comme les nucléotides cycliques qui nous concernent, cette méthode est d'une résolution suffisante pour obtenir tous les para-

mètres désirables. La figure ci-dessous donne une très modeste représentation spatiale du cAMP.



c 3'5' AMP (anti)



c 3'5' AMP (syn)

Si la conformation de la base est relativement plane, il n'en est pas de même des deux autres cycles adjacents. Le ribose, sous forme furannique, occupe une position en "demi-chaîne" et la boucle phosphodiester épouse la forme "twist". La liaison $C_1 - N_1$ (pour les bases pyrimidiques) et $C_1 - N_9$ (pour les bases puriques) étant mobile, la base peut se trouver en position soit *syn* soit *anti* par rapport au sucre.

L'examen de ces nucléotides par NMR a confirmé les renseignements obtenus par diffraction des rayons X en ce qui concerne la conformation du ribose. Les études de NMR ont porté sur un nombre considérable de dérivés parmi lesquels nous comptons le cAMP, le cUMP, le 2'-dcAMP, le cTMP ainsi que certains de leurs analogues acétylés [16,17].

En construisant le cAMP par un modèle de Dreiding, nous constatons que la liaison phosphodiester est très tendue. Si le modèle correspond à la réa-

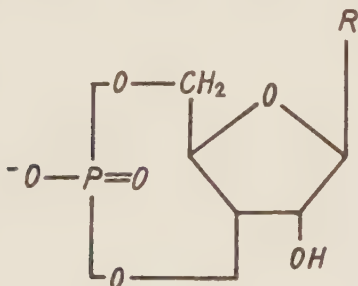
lité spatiale de la molécule, la liaison devrait logiquement posséder un contenu énergétique considérable. Cette supposition sera confirmée par la suite.

En outre, la dernière fonction acide libre du phosphore a un pK inférieur à 3; autrement dit, aux pH physiologiques, cette fonction est quantitativement dissociée. Par ailleurs, il existe plusieurs possibilités de protonation pour différents sites des bases. Zamecnik a postulé l'existence d'une liaison hydrogène intramoléculaire entre C₂' et le N₃ de l'adénine (18).

Cependant les pK (19,20,21) de ces fonctions se trouvent considérablement éloignés des pH usuels ce qui annule leur influence potentielle. Il est à noter que toutes nos mesures seront faites dans des solutions fortement tamponnées. Les variations de pH résultant des réactions mises en jeu seront donc minimes et les erreurs introduites par suite d'une modification hypothétique des noyaux puriques ou pyrimidiques absolument négligeables.

1.2.2. Dérivés

Khorana et coll. (22) ont trouvé une voie de synthèse chimique des nucléotides cycliques, par la cyclisation intramoléculaire des 5'-nucléotides correspondants, en milieu anhydre à chaud.



R = adénine, uridine, cytidine,
guanine

Ultérieurement, Falbriard, Posternak et Sutherland (23) ont synthétisé quelques dérivés du cAMP : N¹-oxyde, N⁶- et 2'-O-monoacyl, N⁶, 2'-O-diacyl. Notons que les réactivités des groupes NH₂ et OH à l'acylation sont suffisamment différentes pour autoriser une synthèse sélective d'un composé mono ou diacylé. Des essais biologiques ont montré, entre autres, que la plupart de ces dérivés ont un potentiel d'action beaucoup plus grand que le cAMP lui-même (24). L'iso AMP cyclique (liaison glycosidique en C'₁-N₃) a été synthétisé (25) et biologiquement testé (26). Comme dans le cas ci-dessus, pour l'hormone étudiée l'iso AMP cyclique se montre 3 à 5 fois plus actif que le cAMP.

Le dérivé 2'-O-butyrylé de l'AMP cyclique et une série de composés N⁶-alcoylés (27) ainsi qu'une suite d'analogues substitués en C₈ et en C₂ ont également été obtenus par voie de synthèse. Les tests biologiques ont également été positifs (28,34,35,102). Robins et coll. compléteront la série des substitués en C₈ et en C₆ (31,32,33) tandis que Lake et coll. feront un dérivé 4'-thio-cAMP (36).

Cette énumération à la fois trop longue et incomplète relève l'importance exceptionnelle de tous les aspects qui touchent cette famille de produits.

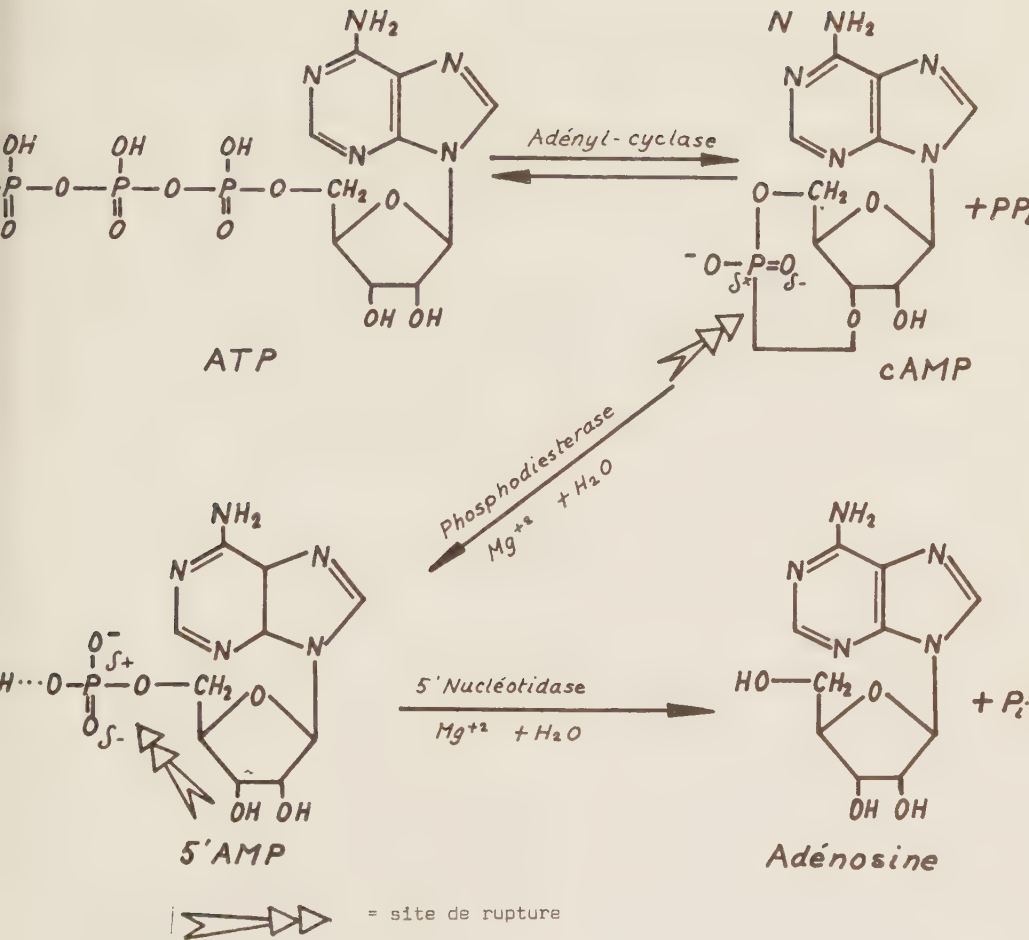
Si les travaux de synthèse et les essais biologiques ont donné des résultats spectaculaires, l'aspect énergétique du problème n'a donné lieu qu'à des recherches en nombre plus restreint. Toutefois, la connaissance thermodynamique des processus biologiques apporte des éclaircissements notables quant à leur mécanisme. C'est pourquoi aucun effort ne sera trop grand pour contribuer à l'étude de ces phénomènes encore mal connus.

1.3. Les expériences de Greengard

En deux séries d'expériences distinctes, le biochimiste américain s'est attaché à l'étude de la réversibilité de l'adénylcyclase et à la détermination de l'enthalpie dégagée au cours de l'hydrolyse de la liaison phosphodiester.

On sait que, dans l'organisme, la concentration du cAMP est apparemment régie par les actions opposées de deux enzymes: l'adényl-cyclase catalyse la formation du cAMP qui, à son tour, peut être dégradé sous l'action de la phosphodiesterase. On obtient alors un 5'-nucléotide pouvant également subir une hydrolyse sous l'influence de la 5'-nucléotidase.

Au cours de l'hydrolyse, le phosphore est l'objet d'une attaque nucléophile par l'ion hydroxyle de l'eau, la réaction étant catalysée soit par la PDE pour les composés cycliques soit par la 5'-nucléotidase pour les analogues du 5'-AMP.



A chaque réaction correspondent des grandeurs thermodynamiques particulières. Dans le cas qui nous occupe, nous dirons deux mots de l'énergie libre ΔG et de l'enthalpie ΔH .

Il est bien établi que l'énergie libre ΔG qui intervient au cours d'une réaction chimique peut être calculée par une équation faisant elle-même intervenir la loi de l'équilibre chimique.

Soit une réaction : $aA + bB \rightleftharpoons cC + dD$

où a,b,c,d représentent le nombre de molécules A,B,C,D qui participent à la réaction. ΔG est fourni par la relation :

$$\Delta G = \Delta G^0 + RT \ln \frac{|C|^c |D|^d}{|A|^a |B|^b}$$

dans laquelle $|A|$, $|B|$, $|C|$, $|D|$ sont les concentrations molaires de A, B, C, D et a, b, c, d les exposants de leur concentration; R est la constante des gaz parfaits ($1,987 \text{ cal mole}^{-1} \text{ degré}^{-1}$), T la température absolue, ΔG^0 la variation d'énergie libre standard.

A l'équilibre, quelles que soient les concentrations initiales de A, B, C et D, on se trouve dans les conditions d'énergie libre minimum et $\Delta G = 0$.

D'où :

$$\Delta G^0 = - RT \ln \frac{|C|_{\text{éq}}^c |D|_{\text{éq}}^d}{|A|_{\text{éq}}^a |B|_{\text{éq}}^b}$$

Puisque la constante à l'équilibre vaut :

$$K_{\text{éq}} = \frac{|C|_{\text{éq}}^c |D|_{\text{éq}}^d}{|A|_{\text{éq}}^a |B|_{\text{éq}}^b}$$

on peut dire que :

$$\Delta G^0 = -RT \ln K_{\text{éq}} = - 2,303 RT \log_{10} K_{\text{éq}} \quad (\text{éq.1})$$

La variation d'énergie libre standard d'une réaction représente en réalité la différence entre l'énergie libre standard des réactifs et l'énergie libre standard des produits, chaque terme étant ajusté à la stoechiométrie des réactions.

De cette manière on peut dire :

$$\Delta G^0 = \Sigma \Delta G^0_{\text{produits}} - \Sigma \Delta G^0_{\text{réactifs}} \quad (\text{éq.2})$$

D'autre part, l'enthalpie est définie de la manière suivante :

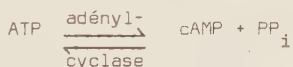
$$\Delta H = \Delta E + \Delta(PV)$$

où le terme ΔE représente la variation d'énergie interne du système.

Or, dans les milieux biologiques, les réactions se déroulent en solution aqueuse diluée où la température, la pression et le volume sont trois paramètres qui demeurent pratiquement constants.

Ainsi, le terme $\Delta(PV)$ devient négligeable et $\Delta H \approx \Delta U$. Or, dans les réactions à $V = \text{cte}$, $\Delta U = Q$ où Q est la chaleur induite par le déroulement du processus chimique.

Par conséquent, si, toutes les conditions limitantes ci-dessus étant respectées, on trouve un moyen permettant de mesurer la chaleur dégagée au cours d'une réaction, on peut dire que la valeur obtenue Q est numériquement égale à l'enthalpie ΔH . Munis de ces considérations de physique élémentaire, examinons l'équation suivante :



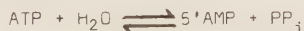
La constante d'équilibre vaut :

$$K_{\text{eq}} = \frac{|\text{cAMP}| \cdot |\text{PP}_i|_{\text{eq}}}{|\text{ATP}|_{\text{eq}}} = 0,065$$

Cette valeur a été mesurée par Greengard et ses collaborateurs (38,40) au moyen de subtiles méthodes analytiques, l'équilibre étant obtenu à l'aide d'adényl-cyclase partiellement purifiée extraite de *Brevibacterium liquefaciens* (37). En appliquant la relation (1) on calcule le ΔG^0 qui vaut :

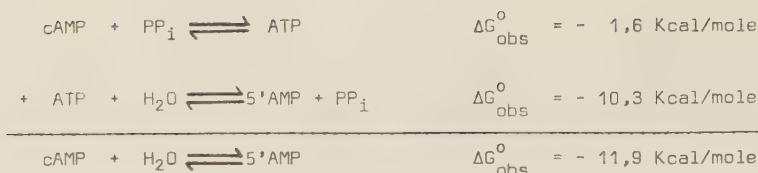
$$\Delta G^0 = - RT \ln K = + 1,6 \text{ Kcal/mole.}$$

Par ailleurs, Alberty (39) entre autres a donné une excellente valeur du ΔG^0 de la réaction suivante :



$$\Delta G_{\text{obs}}^0 = - 10,3 \text{ Kcal/mole}$$

En recourant à l'équation (2) on peut écrire ce qui suit :



On ne manquera pas de relever la valeur relativement grande du $\Delta G_{\text{obs}}^{\circ}$ de la liaison phosphodiester 3' du cAMP.

Après cette étude concernant la réversibilité de l'adényl-cyclase, Greengard (43,44) a déterminé l'enthalpie d'hydrolyse de la liaison 3'-phosphodiester du cAMP et de quelques-uns de ses analogues. Utilisant un microcalorimètre différentiel ultra-sensible de Benzinger (Beckman B 190) il a trouvé, entre autres, les résultats suivants :

Substrat	Enzyme	pH	ΔH Kcal/mole
cAMP	coeur de bovin (41)	7,3	- 14,1
cGMP	coeur de bovin	7,3	- 16,5
cIMP	coeur de bovin	7,3	- 13,4
cUMP	coeur de chien (42)	7,3	- 12,0

Les valeurs de ΔH ont été corrigées pour tenir compte de la chaleur de protonation dégagée par la libération du H^+ issu de la nouvelle fonction acide créée sur le groupe phosphoryle.

Compte tenu de ce qui vient d'être dit, nous avons décidé d'étendre cette étude thermodynamique à divers composés lesquels ont été synthétisés naguère par nos prédécesseurs. Or, en cours d'expérience, il nous est apparu intéressant et accessible d'orienter également nos recherches vers les 5'-nucléotides dont l'enthalpie d'hydrolyse n'a pas encore été déterminée par microcalorimétrie. Puis, comme la véritable liaison rompue lors de l'hydrolyse des nucléotides cycliques est celle en $\text{P-O}(3')$, nous nous sommes appliqués, par analogie, à la détermination du ΔH de deux composés 3'-phosphorylés. Pour ce faire, il importe de considérer trois facteurs déterminants au premier chef, à savoir :

- a) l'isolement d'un enzyme suffisamment actif pour hydrolyser le plus grand nombre de substrats possibles, avec une vitesse suffisante pour donner un signal sensible au calorimètre,
- b) les caractéristiques techniques du microcalorimètre, les aléas de la méthode et l'interprétation des résultats,
- c) la détermination de tous les épiphénomènes parasites (chaleurs de protonation, de dilution etc.).

Ce sont là les problèmes que nous traiterons dans les chapitres qui vont suivre.

2. NUCLEOTIDES CYCLIQUES

2.1. Extraction et préparation de la phosphodiesterase

2.1.1. Généralités

Les travaux concernant la PDE sont nombreux. Il faut dire qu'on la trouve à peu près partout. Nous citerons son isolement à partir de la glande thyroïde (47) et du coeur de bovin (41,50,55,56), du coeur de chien (41,48), des graines de petits pois (52), des lymphocytes humains (57), du coeur, du cerveau (51,58), du tissu adipeux, du rein, du foie (49,53) et des érythrocytes du rat, et même des microorganismes tels qu'Enterobacter aerogenes (54).

Ce sont particulièrement le cerveau et le tissu graisseux des épидидymes du rat qui nous ont servi de source de PDE.

2.1.2. Propriétés de la PDE

2.1.2.1. pH optimum

L'activité maximale des PDE sur le cAMP se situe souvent au pH $\approx$ 8,2 (rein du rat pH = 8,3 (53); cerveau du rat pH = 8,3; thyroïde de boeuf pH = 8,3 (47)). Il n'est pas exclu que le pH optimum varie en fonction des substrats (56). La courbe activité = f(pH) est en forme de cloche, pas trop étroite. Bien qu'il y ait un véritable pH optimum de l'enzyme, on dira, en grossière approximation, qu'une variation d'une unité de pH entraîne une baisse d'activité de 25 à 50% selon la nature du tampon utilisé (58). Ceci est particulièrement valable pour la PDE extraite du cerveau de rat.

2.1.2.2. Inhibiteurs

Ce même enzyme est inhibé par des substances classiques telles la caféine, la théophylline (58), l'EGTA, la papavérine (48) ainsi que par des dérivés du cAMP eux-mêmes insensibles à l'action de la PDE (dibutyryl cAMP).

2.1.2.3. Activateurs

La PDE ne saurait agir sans la présence d'activateurs enzymatiques. C'est le Mg^{2+} qui est le plus couramment utilisé à des concentrations de 1 à 8 mM pour la PDE du cerveau de rat (58), un léger maximum étant perçu à 7 mM. En deçà, l'activité de l'enzyme baisse légèrement pour atteindre 70% du maximum à 0,1 mM. Dans certains cas, on peut également utiliser d'autres cations divalents tels Mn^{2+} , Co^{2+} et Ni^{2+} (56,58).

2.1.2.4. Isoenzymes

Notons à titre indicatif que des recherches sont en cours pour isoler les différents isoenzymes de la PDE. De fructueux travaux ont déjà été publiés parmi lesquels nous retiendrons celui de Kakiuchi (51), qui a étudié deux fractions différentes de la PDE du cerveau de rat, celui de Hrapchak qui a fait les mêmes observations sur la PDE du coeur de bovin (55) et celui de Uzunov (59) qui décrit l'isolement de six facteurs enzymatiques différents. Dans les trois cas, ces travaux font intervenir des méthodes de séparation par électrophorèse sur gel de polyacrylamide.

On a constaté que la PDE est un mélange complexe dont certains composants ont des K_m notablement plus élevés que d'autres ($K_{m1} = 2 \times 10^{-6}$, $K_{m2} = 1,5 \times 10^{-5} M$) (105). Par conséquent, on admet que, suivant la concentration en substrat, ce sont les isozymes au K_m adéquat qui agissent.

2.1.2.5. Activité en fonction de la température

L'activité de la PDE du cerveau de rat croît en raison linéaire de la température jusqu'à $45^{\circ}C$. Passé ce point, on observe une brutale diminution de l'activité par dénaturation rapide de la protéine à partir de $50^{\circ}C$ (58).

2.1.2.6. Spécificité vis-à-vis de différents substrats

L'existence quasi certaine de plusieurs isozymes dans les divers ferments utilisés à ce jour explique la spécificité relativement large dont ils jouissent.

De la littérature, nous extrayons les données du tableau ci-dessous.

Substrat	enzyme			4	5	6
	1	2	3			
cAMP	100	100	100	172	8,3	13
cGMP	-	30,8	53,0	156	6,4	10
cIMP	-	61,5	68,0	169	6,1	11
cUMP	19,8	25,0	26,0	42	4,3	1,0
cTMP	8,5	16,7	14,5	13	1,0	7
cCMP	7,0	1,0	4,0	1,0	1,0	1,2

- 1, PDE coeur de bovin (56)
- 2) PDE I coeur de bovin (55)
- 3) PDE II coeur de bovin (55)
- 4) PDE cerveau de rat (49)
- 5) PDE coeur de rat (49)
- 6) PDE foie de rat (49)

L'examen et la compréhension de ces chiffres appellent les commentaires suivants :

- a) Dans les cas 1,2 et 3, on a chaque fois considéré que l'activité du ferment vis-à-vis du cAMP était égale à 100. Donc les chiffres des colonnes indiquent l'activité relative de l'enzyme considéré sur les différents substrats par rapport à celle du cAMP. Il n'y a pas de relation d'équivalence entre les différentes colonnes.
- b) Dans les cas 4,5,6, l'auteur a déterminé les activités des PDE extraites de différents organes du rat. Par conséquent, ce tableau nous instruit non seulement sur les activités relatives au cAMP pour une PDE particulière, mais fournit d'utiles renseignements sur plusieurs enzymes provenant de différents organes et testés sur divers substrats.
- c) Un bref examen de cet ensemble de chiffres nous permet de constater que, dans tous les cas, le cAMP est le substrat vis-à-vis duquel la PDE manifeste la plus grande activité. Les différents organes du rat fournissent des ferments dont l'activité relative reste dans des rapports semblables; mais c'est le cerveau qui donne de très loin l'activité la plus grande.

On ne saurait clore ce chapitre sans présenter l'étude de Cehovic, Posternak et Charollais (60) qui a constitué un sérieux point de départ de nos propres recherches.

Travaillant également avec une PDE du cerveau de rat, ces auteurs ont testé l'enzyme sur de nombreux dérivés dont nous avons déjà parlé plus haut. Le tableau ci-dessous indique la sensibilité relative des substrats vis-à-vis du ferment.

Hydrolyse inférieure à 10% par rapport au cAMP		entre 10 et 40%		du même ordre de grandeur que le cAMP
cCMP 1% 8-thio cAMP anhydro 2'-8- cAMP 8-hydroxy cAMP N ⁶ -monooctanoyl- cAMP N ⁶ , 2'-O-dibutyryl cAMP N ⁶ -monobutyryl- cAMP 9,4%		2'O-monobutyryl cAMP 12,2% N ⁶ ,2'O-diacétyl cAMP cUMP N ⁶ -n-butyl cAMP 8-bromo cAMP 2'O-butyryl cIMP 8-amino cAMP cTMP N ⁶ -diméthyl cAMP N ⁶ -méthyl cAMP N ¹ -oxyde cAMP 39,4%		cIMP cGMP

Après que les premiers essais de calorimétrie seront faits et que la sensibilité de cet instrument sera connue, nous pourrons opérer un choix des substrats susceptibles de donner de bons résultats.

2.2. Recherche de la PDE

Après avoir effectué les premiers essais cinétiques avec un ferment issu des cerveaux de rats Wistar-Carouge avec lesquels on obtenait de bons résultats, notre fournisseur a dû fermer ses portes, ce qui nous a contraints à l'étude de la PDE provenant de diverses souches de rats. Cette brève recherche s'est montrée intéressante dans la mesure où nous avons constaté, à méthode de préparation égale, de spectaculaires variations quant à l'activité des enzymes obtenus. Voyons en premier lieu les processus d'expérimentation.

2.2.1. Méthodes et préparation

2.2.1.1. Préparation de la PDE du cerveau de rat

On utilise la méthode décrite par Broocker et coll.(61).

Toutes les opérations ont lieu à une température de 4° C.

- Les rats sont sacrifiés par décapitation. On prélève immédiatement les cerveaux qui sont alors homogénéisés au turmix (Omnimixer Sorvall) à 15000 t/min dans cinq volumes de mercaptoéthanol 5mM pendant 4 minutes.

- L'homogénéisation de la matière cérébrale est contrôlée par examen microscopique du broyat (40 x 15 en contraste de phase) où l'on ne voit plus que des gouttelettes de graisses et divers débris.
Le tout est centrifugé pendant deux heures à 30000 g. On récupère le surnageant auquel on ajoute lentement un volume de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ saturé.
- L'enzyme ainsi précipité dans un milieu $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ à 50% de saturation est sédimenté par une heure de centrifugation à 30000 g.
- Le ferment est recueilli puis dissous dans 1/2 volume initial de tampon Tris-HCl 0,1 N, pH 8,3; 8mM en Mg^{2+} , 5 mM en mercaptoéthanol.
- On le place ensuite sous dialyse pendant 12 à 18 heures contre le même tampon changé trois fois dans un rapport de volumes minimum de 1:15.
- En fin de compte l'enzyme est recueilli dans un récipient adéquat.
- On en prélèvera une partie pour doser la teneur en protéines selon Lowry (62).

2.2.1.2. Dosage des nucléotides hydrolysés

La PDE hydrolysant son substrat pour donner sélectivement le 5'-nucléotide correspondant, on peut par l'action supplémentaire de la 5'-nucléotidase (Sigma, *Crotalus adamanteus*) libérer le phosphore sous forme de H_3PO_4 . Celui-ci est dosé par la microméthode de Bartlett (63).

A titre de renseignement on en donne le schéma expérimental.

- Introduire la PDE dans l'éprouvette d'incubation.
- Ajouter le substrat et agiter au whirlimixer.
- Laisser incuber le temps voulu à 25°C.
- Prélever une aliquote et bloquer la réaction au bain-marie bouillant pendant 3 minutes.
- Refroidir les éprouvettes.
- Introduction de la 5'-nucléotidase et agitation au whirlimixer.
- Incubation variable selon le substrat.
- Inactivation de la 5'-nucléotidase par adjonction de TCA 55%.
- Centrifugation et prélèvement d'une aliquote de surnageant puis
- Dosage du P minéral selon Bartlett,
- Lecture au Klett, filtre 65.

A titre purement informatif, nous donnerons, le cas échéant, un exemple des quantités utilisées.

2.2.2. Tests préliminaires

Une première série de cinétiques doit nous fournir les renseignements suivants :

a. Savoir si l'enzyme est fortement dénaturé par la longue période de thermostatisation (de 20 à 90 minutes à 25°C) nécessaire au calorimètre pour atteindre son état d'équilibre.

b) Connaître approximativement le débit de chaleur par interprétation de la cinétique à l'aide des chiffres cités par Greengard et coll.

Ces mesures cinétiques ont été faites avec du cAMP et trois préparations de PDE différentes :

PDE I de rats Ivanovas provenant de Kisslegg

PDE II de rats Wistar-Chaumontet de Carouge

PDE III idem.

Le procédé expérimental était le suivant :

a, 250µl PDE sont préthermostatisés respectivement pendant 30', 60', 75' et 90'.

b) Introduction de 200µl de cAMP 3 mM; incubation et blocage de la réaction au temps voulu.

c) Nucléotidase 50µl à 10U/ml pendant 30'.

d) TCA 55% 100µl et centrifuger.

e) Prise de 130µl pour dosage du P_i par Bartlett.

Les résultats sont résumés dans le tableau ci-dessous :

Ferment	N°	Hydrolyse 100% en x)	Préthermostatisation	mg prot/ml
PDE I	1	16' - 18'	30'	10
PDE I	2	16' - 18'	60'	10
PDE I	3	18' - 19'	90'	10
PDE I	4	18' - 19'	120'	10
PDE II	5	4' - 5'	30'	10
PDE III	6	4' - 5'	60'	9,5
PDE I	7	4' - 5'	75'	10
PDE III	8	4' - 5'	120'	10

x) détermination fondée sur $v_{\text{départ}}$.

Nous constatons deux points importants :

- 1) L'activité des PDE n'est pas altérée par la thermostatisation.
- 2) L'enzyme provenant des rats Wistar est 4 à 5 fois plus actif que la PDE extraite des Ivanovas.

2.2.3. Sur les divers ferments utilisés

Une brève enquête nous apprend que

- 1) La souche originale des Wistar-Carouge provient du Dr Sabourdy au CNRS d'Orléans-la-Source.
- 2) On peut trouver d'autres rats chez YFA à Lyon (Sprague-Dawley).
- 3) Il est possible d'acquérir des rats Wistar dans un institut zurichois.

D'autre part, Klotz et Stock (64) décrivent une méthode d'extraction de la PDE à partir du tissu graisseux des épидидymes de rat laquelle hydrolyse le cUMP avec une forte activité. De leur côté, Miki et Yoshida (65) purifient partiellement la PDE du cerveau de rat par une méthode relativement simple de "freeze-thawing".

Il ne faut pas oublier que les mesures thermodynamiques ayant lieu dans un instrument à sensibilité limitée, nous avons besoin d'un ferment le plus actif possible, qui doit être obtenu en grande quantité par une méthode simple, à partir d'une souche de rats commercialement accessible.

C'est pourquoi nous avons testé les méthodes susmentionnées sur le plus grand nombre disponible de souches différentes.

De plus, Greengard mentionne l'impossibilité matérielle pour lui d'hydrolyser le cXMP et le cTMP faute de posséder un enzyme aux vertus hydrolysantes suffisamment fortes compte tenu des limites de son appareillage. Or, ces deux substrats étant commercialisés, nous les avons systématiquement testés en compagnie du cAMP avec le but avoué de trouver l'enzyme qui permettra de les hydrolyser dans le calorimètre.

Il faut reconnaître que les résultats obtenus par les méthodes de Klotz et Miki ne sont guère brillants. Nous les résumerons à ce qui suit.

Appliquée au tissu graisseux des épидидymes de rat Sprague-Dawley YFA, la méthode de Klotz a toujours été absolument négative. A notre avis une erreur expérimentale inconnue a complètement faussé les résultats. L'homo-

générisation de la graisse, opérée minutieusement par le broyage du tissu au turmix 4' à 15000 t/min suivie d'un passage à l'ultra-turax (30000 t/min pendant 30") et terminée enfin par un broyage au Potter (10 aller et retour) a été contrôlée au microscope dans lequel on ne voit absolument aucune cellule. Cette homogénéisation n'étant pas orthodoxe, peut-être aurait-il mieux valu que l'on procède par action de la collagénase avant de faire sauter les cellules (66,67). On peut également se demander si l'enzyme n'est pas involontairement éliminé dans le chapeau de graisse flottante (mais compacte) que l'on ôte du milieu après la centrifugation. Il n'est pas interdit de supposer que les protéines sont entraînées mécaniquement par les lipoprotéines en suspension dans la liqueur d'extraction. Le mystère reste entier.

Le processus de freeze-thawing décrit par Miki a été expérimenté comparativement à la méthode de Broocker, sur des rats Sprague-Dawley, Wistar Zurich et Wistar-Carouge provenant d'un élevage privé et temporaire.

Dans tous les cas le freeze-thawing ne donne pas d'amélioration très sensible par rapport à la méthode de Broocker; compte tenu des complications expérimentales qu'entraîne le processus du Japonais, la méthode doit être abandonnée. Un point positif pourtant, au terme de cette débauche d'essais : Les ferments extraits aussi bien des rats mâles que femelles, Wistar-Zurich que Wistar-Carouge ont une activité très semblable sur les deux substrats soit le cAMP et le cTMP.

Ces expériences nous permettent de tirer une conclusion provisoire : Aucune méthode de préparation ne nous fournit un enzyme suffisamment actif pour tenter une mesure calorimétrique sur un produit non testé par Greengard et Sturtevant. Dans cette optique, nous avons déjà dit que notre substrat n° 1 est le cTMP. Pour espérer obtenir une réponse au calorimètre, il nous faut, dans le plus favorable des cas une hydrolyse de

1% par minute pour

$$[S] = 3 \text{ mM}$$

dans les mêmes conditions d'incubation que ci-dessus.

Avec les ferments obtenus nous sommes loin du compte. Autrement dit, à défaut de la qualité, nous devons obtenir la quantité; pour ce faire, nous renoncerons à augmenter l'activité de l'enzyme pour accroître la concentration des protéines. Bien entendu, nous utiliserons des rats de la meilleure souche, c'est-à-dire les Wistar-Zurich ou les Wistar-Carouge de notre élevage, accompagnés par des spécimens que nous a remis le Dr. Sabourdy.

2.2.4. Concentration des ferments

Dans ce but, deux méthodes différentes ont été mises à contribution :

- a) dialyse
- b) lyophilisation.

2.2.4.1. Dialyse

En dialysant le ferment contre une solution d'un polymère de haut poids moléculaire, il devrait être théoriquement possible de concentrer les protéines contenues dans la saucisse de Wisking.

Les opérations sont les suivantes :

Essai N ^o	Saucisse de Wisking	Solution de dialyse
1	3 ml PDE Wistar selon Brocker	10% polyvinylpyrrolidone PM 24000 Fluka purum dans tampon habituel
2	Idem	10 % idem PM 40000
3	Idem	10% polyéthylèneglycol PM 120000 idem

Après une à deux heures d'incubation, les protéines précipitent dans les trois sacs à dialyse. On centrifuge, on recueille le surnageant qui est testé sur le cAMP et le cTMP.

Les dosages du P_i sont illisibles en raison du blanc enzyme qui est beaucoup trop fort. L'enzyme a perdu pratiquement toute son activité.

L'expérience est refaite, mais l'incubation contre le polymère est limitée à 15 minutes. On évite ainsi la précipitation de l'enzyme dans le sac à dialyse.

Les dosages nous donnent des résultats nuls à cause de la formation d'un trouble bleu-blanc en présence de molybdate d'ammonium. Il est possible que cette aberration provienne d'un mauvais pouvoir d'extrusion de la membrane. La méthode doit malheureusement être abandonnée.

2.2.4.2. Lyophilisation

2.2.4.2.1. Principe de la méthode

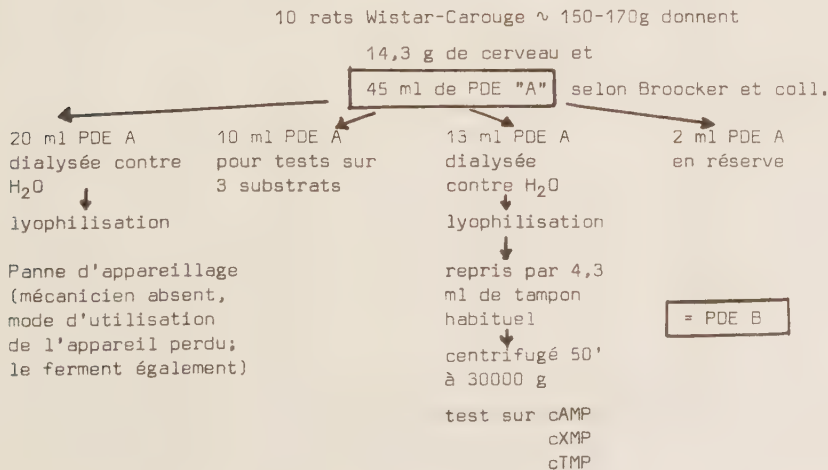
L'enzyme, dissous dans le milieu tamponné Tris-HCl 0,1 N à pH = 8,3, 8 mM en Mg^{2+} et 5 mM en mercaptoéthanol, peut être dialysé contre de l'eau pour éliminer les sels du tampon, puis lyophilisé. En le redissolvant dans un volume de tampon fortement réduit, on augmente la concentration de la liqueur en protéines et conséquemment son activité enzymatique.

2.2.4.2.2. Mode opératoire

- a) Préparation de la PDE (selon Broocker et coll.) du cerveau de rat.
- b) La tester sur plusieurs substrats en faisant varier la concentration de l'enzyme $|E|$.
- c) Déterminer la teneur en protéines selon Lowry.
- d) Après les premiers dosages de l'activité sur les trois substrats commerciaux (cAMP, cTMP, cXMP), dialyser l'enzyme à mort contre H_2O bidistillée.
- e) Lyophiliser la solution en plusieurs fractions.
- f) Reprendre la poudre obtenue par des quantités variables de tampon.
- g) Déterminer la teneur en protéines suivant Lowry.
- h) Répéter les essais d'hydrolyse dans les mêmes conditions que sous b).
- i) Comparer les résultats obtenus.

2.2.4.2.3. Ferment concentré (Rats Wistar-Carouge)

a) Schéma des opérations



Le dosage des protéines selon Lowry donne :

PDE A 7,6 mg prot/ml

PDE B 16,2 mg prot/ml.

b) Dosage de l'activité :

L'activité A est définie comme étant le nombre initial de μ moles de substrat hydrolysées à 25°C par mg de protéine et par minute.

Nous avons fait trois cinétiques avec $|E|$ variable au moyen de la PDE A qu'on possède en volume suffisant et de simples dosages de A avec la PDE B.

c) Schéma de principe :

On introduit dans l'éprouvette à incubation :

- Tampon (de 0 à 700 μ l) + PDE A (de 1000 à 300 μ l) selon la valeur de E.

Toutefois tampon + PDE = 1 ml.

- Substrat 500 μ l.

La digestion a lieu durant un temps voulu, au terme duquel on prélève 300 μ l qui sont plongés dans un bain-marie bouillant pendant 3 minutes. Après refroidissement de l'aliquote, on ajoute deux fois 50 μ l de nucléotidase à 10 U/ml pendant 30'. Blocage de l'enzyme par 150 μ l de TCA 55%, centrifugation à 1000 g pendant 15' et prélèvement de 2 x 200 μ l pour dosage du P minéral.

d) Substrats

cAMP $|S|$ = 3,14 mM cTMP $|S|$ = 2,85 mM cXMP $|S|$ = 2,49 mM

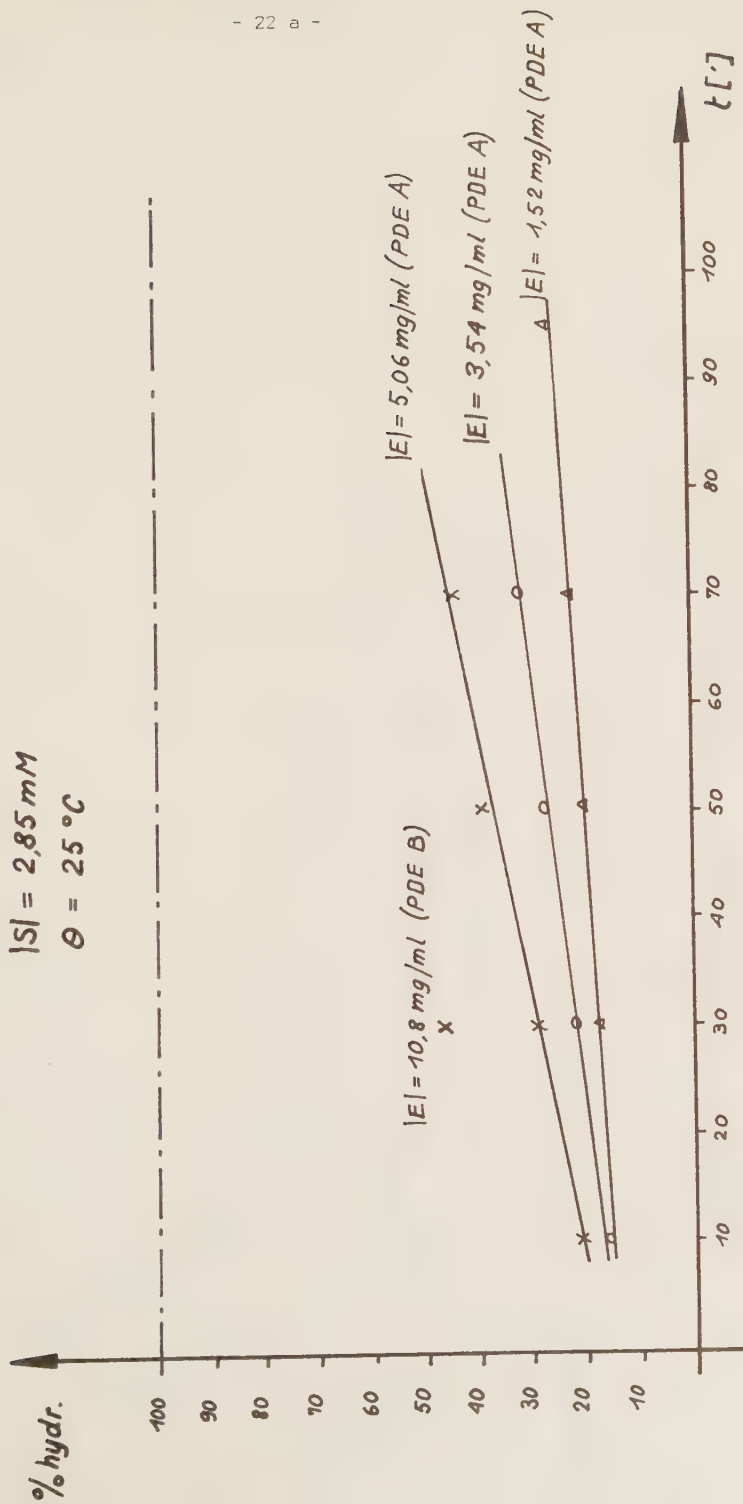
e) Résultats

Substrat	PDE	$ E $ mgprot/ml	100% hydrolyse en	A μ mole/mgprot/min
cAMP	A	0,76	66'	0,062
	A	1,52	29'	0,072
	A	3,54	12'	0,074
	A	5,06	9'	0,069
	B	10,8	~ 3,5'	~ 0,083
cTMP	A	1,52	780'	~ 0,0024
	A	3,04	345'	~ 0,00235
	A	5,06	270'	~ 0,0021
	B	10,8	95'	~ 0,0028
cXMP	A	1,52	105'	~ 0,016
	A	3,04	74'	~ 0,0095
	A	5,06	65'	~ 0,0076
	B	10,8	68'	~ 0,0034 ???

Hydrolyse du cTMP par les PDE A et B (Wistars-Carouge)

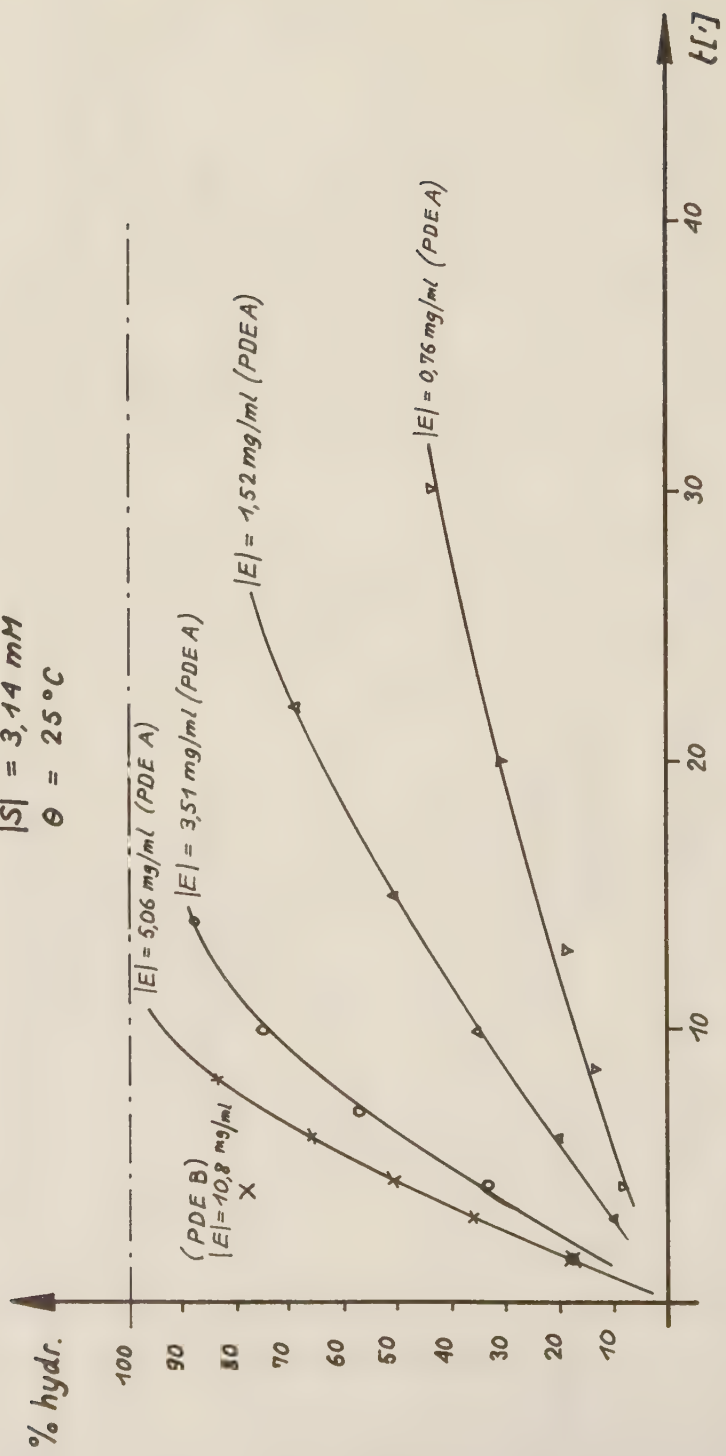
$|S| = 2,85 \text{ mM}$

$\theta = 25^\circ \text{C}$



Hydrolyse du cAMP par les PDE A et B (Wistars-Carouge)

$|S| = 3,14 \text{ mM}$
 $\theta = 25^{\circ}\text{C}$

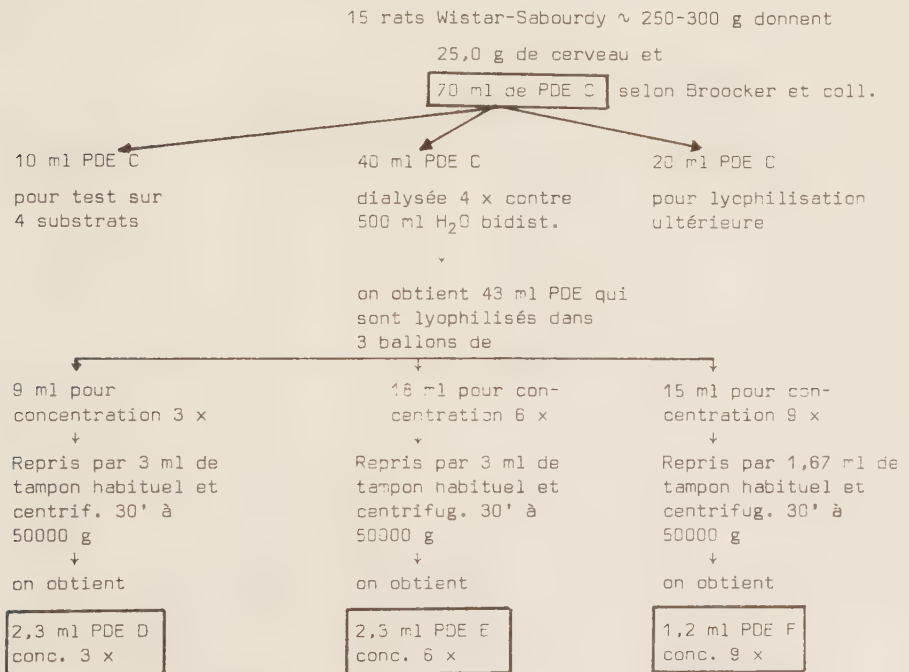


L'activité de cet enzyme est excellente sur le cAMP. Quant aux deux autres substrats on peut dire que le minimum nécessaire aux expériences calorimétriques est atteint par la PDE B sur le cTMP. Pour le cAMP, par de communautaire, car c'est le premier test sur ce substrat.

2.2.4.2.4. Ferment concentré (Rats Wistar-Sabourdy)

Nous allons compléter les résultats présentés ci-dessus en concentrant de manière encore beaucoup plus forte un enzyme extrait des rats "Wistar-Sabourdy".

a) Schéma des opérations



Le dosage des protéines suivant Lowry donne :

PDE C = 8,1 mg prot/ml

PDE D = 16 mg prot/ml

PDE E = 31 mg prot/ml

PDE F = 61 mg prot/ml

Le dosage de l'activité enzymatique s'effectue selon les mêmes principes que précédemment. Toutefois, le faible volume d'enzyme D, E, F obtenu nous interdit de faire des cinétiques. Nous sommes obligés de nous contenter d'un dosage de l'activité, fondé sur une mesure unique du pourcentage d'hydrolyse après une incubation de 30 minutes pour le cXMP et le cTMP et de 3 minutes pour le cAMP et le cGMP.

b) Substrats

cAMP |S| = 2,57 et 3 mM

cTMP |S| = 2,4 mM

cXMP |S| = 2,4 mM

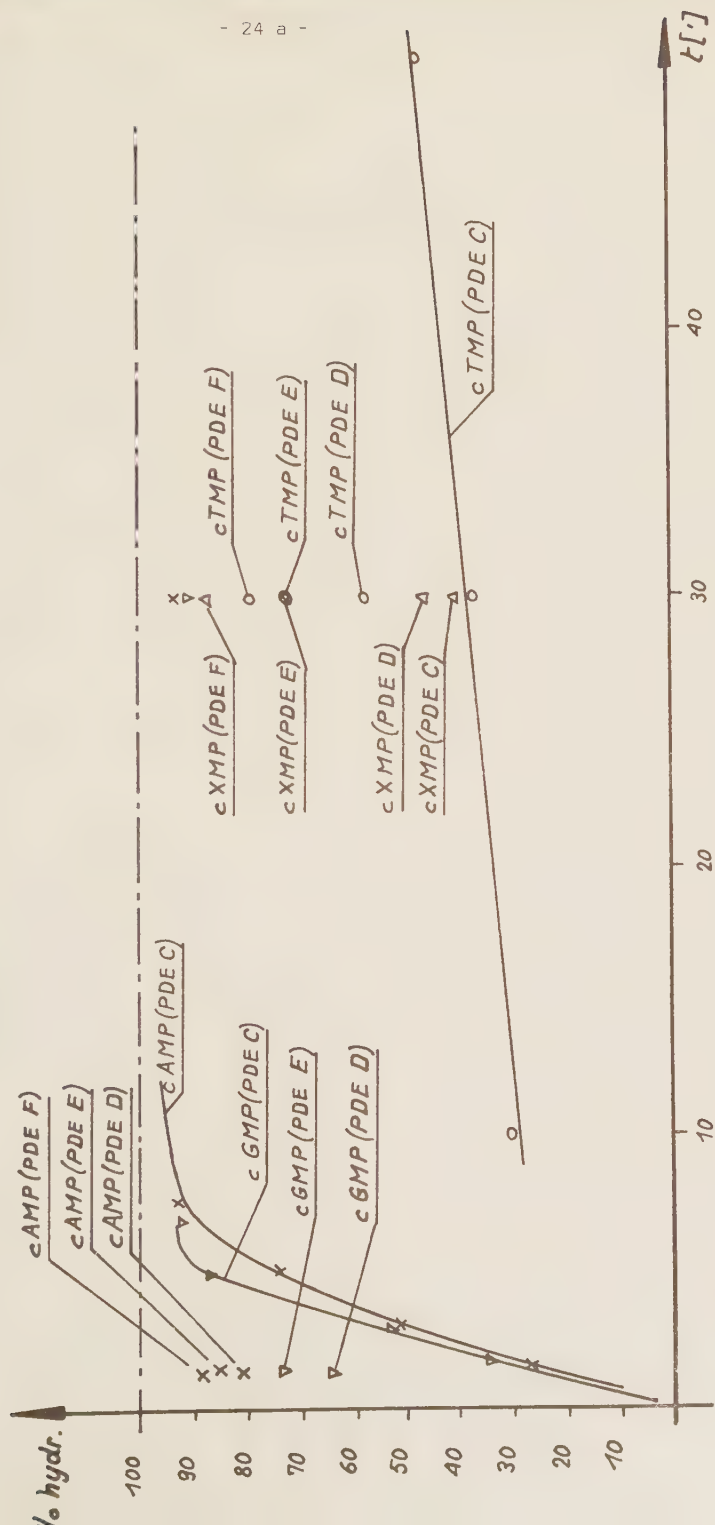
cGMP |S| = 3,0 mM

c) Résultats

x) trop imprécis pour être calculé sérieusement

Substrat	PCE	E	100 % d'hydrolyse en	A
cAMP	C	5,4	5'30"	0,087
	D	10,7	1'45"	0,16
	E	20,7	1'30" à 1'45"	x)
	F	40,3	1'15" à 1'30"	x)
cTMP	C	5,4	200'	0,0022
	D	10,7	90'	0,025
	E	20,7	60'	0,193
	F	40,3	53'	x)
cXMP	C	5,4	76'	0,0059
	D	10,7	65'	0,035
	E	20,7	42'	0,028
	F	40,3	35'	x)
cGMP	C	5,4	5'	0,11
	D	10,7	2'15"	0,12
	E	20,7	1'45" à 2'	x)
	F	40,3	x)	x)

Activité PDE C-D-E-F sur $c\overset{\circ}{A}MP$, $c\overset{\circ}{T}MP$, $c\overset{\Delta}{X}MP$, $c\overset{\nabla}{G}MP$ (Wistars D^r Sabourdy)



2.2.4.3. Commentaires

Les deux séries de lyophilisations nous montrent que la méthode est valable pour obtenir, dans un volume donné, un enzyme dont l'activité peut être réglée dans une large gamme de valeurs.

Dans le cas des cAMP et cGMP, aucun problème; l'hydrolyse très rapide nous permet de travailler avec un ferment suffisamment actif pour autoriser l'emploi d'une échelle relativement peu sensible du calorimètre. Ce n'est pas un hasard si Greengard a pu examiner ces produits sans difficulté en ce qui concerne l'enzyme.

Nous avons dit que ce même auteur a renoncé à déterminer l'enthalpie d'hydrolyse du cTMP (entre autres) parce qu'il n'avait pas de ferment assez actif pour que le débit de chaleur conséquent à la rupture de la liaison 3'-cyclique soit mesurable. Avec notre méthode de concentration de l'enzyme, nous pouvons dépasser le seuil minimal de sensibilité de l'appareil et tenter une mesure.

La même remarque s'applique au cXMP. Nous verrons que le cTMP représente, en réalité, les possibilités les plus extrêmes de l'utilisation du microcalorimètre.

Les valeurs de A indiquées dans les tableaux de mesures sont à considérer comme une estimation de leur ordre de grandeur, sans plus. En effet, les conditions expérimentales qui nous sont imposées par les paramètres techniques du microcalorimètre nous contraignent à travailler avec une $|E|$ très élevée laquelle exclut toute interprétation biologique des phénomènes obtenus.

On pourrait aisément leur en donner une en introduisant beaucoup moins d'enzyme A, B ... etc. dans le milieu d'incubation. Ce serait une méthode relativement simple d'exprimer dans un langage compréhensible les modifications subies par le ferment au cours de sa concentration.

En effet, la lyophilisation implique une solidification brutale de l'enzyme, dialysé auparavant contre H_2O , par l'immersion des ballons dans un mélange d'alcool et de carboglace. Par la force des choses, ce processus est analogue à celui de Miki et son freeze-thawing. La dissolution du lyophilisat dans le tampon est rarement complète; c'est pourquoi on élimine la fraction insoluble par centrifugation. La suspension d'enzyme ainsi obtenue est sensiblement plus visqueuse que la solution originale de Broocker.

D'ailleurs, la PDE F adhère tant au fond de l'éprouvette que son pipetage présente de sensibles difficultés.

Il faut malheureusement déplorer un fâcheux incident expérimental. Les dosages du cTMP sont tous entachés d'une erreur provenant, nous l'avons prouvé, de la méthode de Bartlett. Le cTMP subit une légère hydrolyse durant le chauffage des tubes de Klett pendant 7 minutes, le déoxyribose étant probablement sensible à la cuisson en milieu acide. Nous avons corrigé cette erreur en procédant selon la prescription de Fiske et Subba Row (68) qui évite l'ébullition mais nécessite sensiblement plus de produit. Quant aux rats, notre problème est résolu: nous prendrons les Wistar-Zürich, aussi efficaces que les Wistar-Chaumontet et leur source originale du Dr Sabourdy.

En résumé, nous pouvons dire qu'à ce stade de la recherche nous avons en mains

- a) une souche de rats facilement accessible
- b) un enzyme aux caractéristiques suffisantes pour autoriser une étude systématique de son action sur la série de substrats qui nous intéressent.

2.3. Les cinétiques d'hydrolyse

2.3.1. Considérations générales

Nous fondant sur les possibilités d'acquisition ou de synthèse des produits, nous avons testé un certain nombre de substrats. La substance de référence est le cAMP à partir duquel on calculera les vitesses relatives. En outre, pour les produits qui sont susceptibles de passer au calorimètre, nous avons indiqué la vitesse initiale d'hydrolyse qui nous donne une indication suffisamment précise pour choisir l'échelle de sensibilité de l'appareil. Dans onze cas sur quatorze, l'estimation a été correcte.

Nous n'avons pas relevé de variation sensible de l'activité entre les différentes préparations de la PDE. Cette régularité provient du fait que, par besoin de quantités massives d'enzyme et par souci de rendement des opérations, nous avons appliqué à ces modes préparatifs une escalade dans le nombre des victimes qui, d'une quinzaine, a rapidement franchi le quarteron pour aller jusqu'à frôler l'hécatombe. Ces massacres nous permettent d'appliquer la théorie des grands nombres et de considérer que le ferment est un mélange statistique de PDE indépendant des variations saisonnières, sexuelles et pondérales de nos malheureuses victimes.

C'est chaque fois de l'enzyme frais et non lyophilisé qui a été utilisé.
Par dosage simplifié des protéines (lecture de l'absorption UV à 280 nm) (69)
nous avons toujours ajusté les concentrations à

$$E_{\text{départ}} = 7,5 \text{ mg prot/ml.}$$

Par ailleurs, les produits de réaction ont été décelés par chromatographie
sur papier Whatman N° 1 dans les trois systèmes suivants :

- a) Isopropanol - NH_4OH - H_2O (6:3:1) (v/v)
- b) Ethanol - acétate de NH_4 0,5 M (5:2)
- c) Isopropanol - $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1% (2:1) sur papier imprégné.

On s'assure ainsi qu'il ne se forme que du 5'-phosphate par action de la PDE
seule, que le 5'-phosphate est quantitativement hydrolysé par la 5'-nucléo-
tidase, que l'incubation avec les deux enzymes ne donne pas d'autre produit
de réaction.

La pureté des produits a été dûment contrôlée par chromatographie dans les
trois systèmes de solvants susmentionnés. Sauf indication contraire, les
tests étaient négatifs. Les concentrations ont été calculées sur la base des
dosages du phosphore total par Fiske et SubbaRow (68), le phosphore minéral
ayant été mesuré à titre de contrôle (négatif également).

Les cinétiques ont eu lieu selon la prescription précédemment décrite. A titre
indicatif signalons que, par souci de reproduire les conditions expérimentales
du calorimètre en ce qui concerne les rapports de volume, nous avons chaque
fois utilisé deux fois plus d'enzyme que de substrat. D'une manière générale
nous avons eu :

$$\begin{array}{l} 2 \times \mu\text{l PDE à } 7,5 \text{ mg/ml} \\ 1 \times \mu\text{l Substrat à } \sim 7,5 \text{ mM} \\ \hline 3 \times \mu\text{l où } |E| = 5 \text{ mg/ml} \\ \quad |S| \approx 2,5 \text{ mM} \end{array}$$

2.3.2. Résultats

Les résultats sont consignés dans le tableau suivant :

Substrat	v_o ($\mu\text{mole/min}$) ^{x)}	v_{relative}
cAMP	0,51	100
cGMP	0,57	112
cIMP	0,51	100
2'-d-cAMP	0,38	75
6-Cl-P _U -rib-3'5'-P	0,41	80
8-amino-cAMP	0,34	67
N ¹ -oxyde-cAMP	0,19	38
cXMP	0,19	38
9-bromo-cAMP	$\sim 0,18a)$	36
N-6-méthyl cAMP	0,11	21,4
N-6-n-butyl-cAMP	0,08	15,5
N-6-diméthyl-cAMP	0,07	14,3
cUMP	0,06	11,5
2'-O-butyryl cIMP	- b)	-
cTMP	$\sim 0,01c)$	$\sim 2,7$
8-bromo-cIMP	- b)	-
8-bromo-cGMP	- d)	-
8-hydroxy-cAMP	~ 0	~ 0
2'-O-butyryl-cAMP	0,06	11,5
2'-O-butyryl-cGMP	- d)	-
N-2-butyryl-cGMP	0,20	39
Ethéno-cAMP	0,05	10,2
N-6-monobutyryl-2'-d-cAMP	$\ll 0,01$	< 1
N-6-monobutyryl-cAMP	$\sim 0,01$	~ 3
2'-O-butyryl-8-thio-cAMP	0	0
N-6-butyryl-8-thio-cAMP	0	0
Dibutyryl-8-thio-cAMP	0	0
Ribose-3,5-phosphate	$\sim 0,01$	~ 2
Xylose-3,5-phosphate	0	0

x) déterminé par la pente initiale

Commentaires

- a) Le 8-bromo-5'AMP est très mal attaqué par la 5'-nucléotidase. On arrive à l'hydrolyser en ajoutant à plusieurs reprises des doses massives d'enzyme. Le résultat de la cinétique est par conséquent très imprécis.
- b) Le 2'-O-butyryl-5'IMP ainsi que le 8-bromo-5'IMP se montrent encore plus résistants à l'action de la 5'-nucléotidase.
- Il est pratiquement impossible d'établir une cinétique par la méthode présente. Cependant, par contrôle chromatographique nous sommes arrivés à la conclusion que ces deux substrats s'hydrolysent en présence de PDE. Leur introduction dans le microcalorimètre a donné lieu à des mesures positives bien que l'interprétation des valeurs dues à l'hydrolyse très lente du 8-bromo-cIMP ait été des plus difficiles.
- c) Le cTMP étant relativement labile lors du chauffage en milieu H_2SO_4 1 N qu'il subit au cours du dosage selon Bartlett, la détermination de v_0 et v_{rel} est imprécise.
- d) Ces substrats ne sont pratiquement attaqués ni par la PDE ni par la 5'-nucléotidase.

2.4. Les substrats testés au calorimètre

La pureté des substances a été mesurée par dosage du phosphore total et vérifiée par examen chromatographique et détermination du phosphore minéral. Dans chaque cas, les chromatographies ne révèlent la présence que d'un seul produit dont le R_f est analogue aux valeurs indiquées dans la littérature. La présence d'un seul nucléotide est donc certaine.

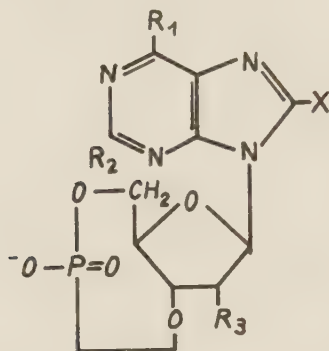
L'ensemble des valeurs obtenues constitue une population de laquelle on peut extraire les grandeurs statistiques suivantes :

- a) l'étendue
b) la moyenne
c) la variance

$$s^2 = \frac{\sum (X_i - \bar{X})^2}{n - 1}$$

où X_i = ième valeur du paramètre dont la moyenne est $\bar{X}$
 n = nombre de valeurs X_i ($4 \leq n \leq 6$)

2.4.1. Dérivés de la purine



a) cAMP (Serva, Heidelberg) PM = 347

Pureté indiquée $\geq 96\%$ Acide libre.

$R_1 = \text{NH}_2$

$R_2 = X = \text{H}$

$R_3 = \text{OH}$

Pureté mesurée : $\bar{x} = 101,2\%$ admis à 100% .

b) β -bromo-cAMP Boehringer PM = 408,1

$R_1 = \text{NH}_2$

$R_2 = \text{H}$

$R_3 = \text{OH}$

$X = \text{Br}$

(Mannheim)
a) $96,7 - 99,0$

b) $\bar{x} = 98,1$

c) $s^2 = 1,2$

d) $n = 4$

Pureté indiquée = 98%

c) cXMP Boehringer PM = 346

$R_1 = R_2 = \text{OH}$

$X = \text{H}$

$R_3 = \text{OH}$

a) $74,5 - 76,0$

b) $\bar{x} = 75,5$

c) $s^2 = 0,4$

d) $n = 5$

Pureté indiquée = 79%

d) 2'-O-déoxy-cAMP Boehringer PM = 335

$R_1 = \text{NH}_2$

$R_2 = R_3 = X = \text{H}$

a) $81,9 - 83,4$

b) $\bar{x} = 82,8$

c) $s^2 = 0,3$

d) $n = 6$

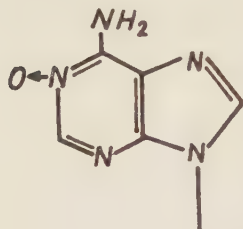
Pureté indiquée = 82%

e) N¹ - oxyde-cAMP

Synthèse personnelle (cf. plus loin)

PM = 363

Acide libre



Ribose - 3'-5'-P

a) 91,4 - 94,6

b) $\bar{x}$ = 92,6

c) s^2 = 1,6

d) n = 9

f) cGMP

Boehringer

PM = 367

R₁ = OH

a) 95,9 - 99,5

Pureté indiquée = 80 %

R₂ = NH₂

b) $\bar{x}$ = 98,7

R₃ = OH

c) s^2 = 3,0

X = H

d) n = 5

g) 6-Cl-Pur-rib-3'5'-P

Boehringer

PM = 370,6

R₁ = Cl

a) 81,3 - 82,8

Pureté indiquée = 90 %

R₂ = X = H

b) $\bar{x}$ = 81,0

R₃ = OH

c) s^2 = 1,6

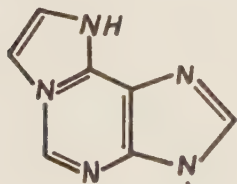
d) n = 6

h) Ethéno-cAMP

P-L Laboratories
Milwaukee USA

PM = 354

Pureté indiquée = 95 %
± 5%



Ribose-3'-5'-P

a) 93,2 - 94,2

b) $\bar{x}$ = 93,8

c) s^2 = 0,2

d) n = 6

i) 2'-O-butyryl-cIMP

Boehringer

PM = 422

Pureté indiquée = 88 %

R₁ = OH

a) 86,1 - 91,1

R₂ = X = H

b) $\bar{x}$ = 88,9

R₃ = O-butyryl

c) s^2 = 3,9

d) n = 5

j) 8-bromo-cIMP

$R_1 = OH$

$R_2 = H$

$X = Br$

$R_3 = OH$

Boehringer

a) 88,5 - 93,4

b) $\bar{x} = 90,5$

c) $s^2 = 3,0$

d) $n = 7$

PM = 409

Pureté indiquée = 98 %

k) cIMP

$R_1 = OH$

$R_2 = X = H$

$R_3 = OH$

Provenance personnelle

a) 83,2 - 88,0

b) $\bar{x} = 85,2$

c) $s^2 = 3,3$

d) $n = 7$

PM = 347

Acide libre

l) N-2-monobutyryl-cGMP

$R_1 = R_3 = OH$

$R_2 = NH\text{-butyryl}$

$X = H$

Sigma (St. Louis, USA)

a) 74,3 - 76,2

b) $\bar{x} = 75,4$

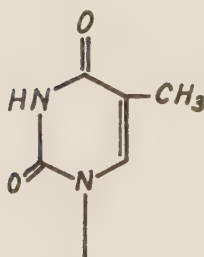
c) $s^2 = 0,7$

d) $n = 5$

PM = 437

2.4.2. Dérivés de la pyrimidine

m) cTMP



déoxyribose 3'-5'P

Boehringer

a) 77,3 - 81,4

b) $\bar{x} = 78,8$

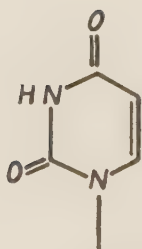
c) $s^2 = 2,9$

d) $n = 6$

PM = 328

Pureté indiquée = 85 %

n) cUMP



Ribose 3'-5'P

Boehringer

a) 88,3 - 90,9

b) $\bar{x} = 90,0$

c) $s^2 = 1,1$

d) $n = 5$

PM = 328

Pureté indiquée = 81 %

Les impuretés présentes dans les substrats ne sont pas des dérivés de nucléotides (pas de fluorescence UV sur les chromatogrammes). Il s'agit sans doute d'eau et (ou) de sels minéraux.

2.4.3. Synthèses

2.4.3.1. cIMP (selon Robins et coll.(31))

Le principe de la synthèse repose

- a) sur la désamination oxydative du cAMP
- b) sur la purification du cIMP (élimination des sels minéraux) par adsorption sur colonne de charbon actif.

On agite 400 mg (1,2 mmole) de cAMP en présence de 3 ml H_2O , de 0,6 ml AcOH et de 0,5 g de $NaNO_2$ pendant 4 heures à $0^\circ C$, pendant une nuit à température ordinaire et deux jours à $4^\circ C$. On évapore et on coévapore à sec en présence de 1 ml de AcOH. Le résidu est repris par un minimum d'eau et on le place sur une colonne de charbon actif (1 x 20 cm). On lave avec 200 ml d'eau et on élue par adjonction de 150 ml d'un mélange de H_2O - triéthylamine - éthanol (50:4:50, v/v). On évapore et on coévapore deux fois l'éluat avec EtOH. On reprend le résidu par 10 ml EtOH auxquels on ajoute 1 ml HCl conc. pour acidifier la solution. Le mélange est agité à $4^\circ C$ et laissé au repos pendant une nuit. Le produit cristallise spontanément. On le recueille par centrifugation et on le sèche sous vide poussé après deux lavages à l'alcool absolu. On ajoute 10 ml d'éther aux eaux de lavage (~ 20 ml). Le produit précipite spontanément. On le recueille après centrifugation; double lavage à l'éther.

On obtient : Fraction I 90,3 mg + eaux-mères 28,3 mg = 118,6 mg

Le rendement est de 28 % ce qui, au premier abord, paraît faible. La raison en est due à la mauvaise élution du charbon actif qui retient, malgré tous nos efforts, une importante fraction du produit.

Lors de synthèses ultérieures, en évitant la purification sur colonne de charbon actif, nous avons obtenu des rendements supérieurs à 90 %, mais le produit contenait environ 25 % de sels minéraux.

2.4.3.2. N-1 oxyde-cAMP (selon Falbriard et coll. (23))

La méthode préparative consiste à :

- a) oxyder le cAMP par l'acide monoperphthalique à température ordinaire à pH = 5
- b) extraire l'excès de peracide par l'éther en milieu acide

c) purifier le produit par chromatographie préparative sur papier (séparation entre le N¹-oxyde formé et le cAMP restant).

a) Préparation de l'acide monoperphthalique

- On dissout 0,5 mole de $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ dans 250 ml H_2O . La solution est refroidie par un mélange de glace + sel. On ajoute 63 ml de H_2O_2 à 30 % sous agitation à une température comprise entre -5 et 0°C. On introduit 74 g d'anhydride phthalique finement broyé en maintenant l'agitation et la basse température pendant 30 minutes.
- On agite le tout dans une ampoule à robinet avec 350 ml d'éther. On acidifie prudemment par une solution glacée de 30 ml de H_2SO_4 dans 150 ml H_2O . On complète l'extraction de l'acide monoperphthalique par djonction de 2 x 150 ml d'éther.
- On réunit les extraits étherés qu'on lave par 2 x 200 ml de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 40 %. La solution est séchée sur MgSO_4 (50 g) pendant une nuit à 4°C.

Le rendement de la solution est le suivant :

- a) titrage du peracide par iodométrie : c = 0,5 M
- b) rendement η = 65 % (littérature = 76-86 %)

b) Oxydation du cAMP

A 104 mg de cAMP et 7,5 ml NaOH 0,04 M (équimolaire), on ajoute 1,8 ml d'acide monoperphthalique (excès 3 fois) dont on chasse l'éther par un courant d'air. Le pH est ajusté à 5,0 au moyen de NaOH 0,1 N. On laisse reposer la solution à l'obscurité à température ordinaire pendant un jour puis on l'acidifie par 1,2 ml de H_2SO_4 0,5 M et on extrait l'excès de réactif par 3 x 10 ml d'éther fraîchement distillé. Après avoir ajusté le pH à 7,0 par NaOH, on évapore à sec à température réduite (30°C) et on reprend le résidu par un minimum d'eau (0,5ml).

Le produit est ensuite purifié par chromatographie sur papier Whatman 3 MM préalablement lavé avec le solvant d'élution et rincé à fond par de l'eau déionisée et de l'eau bidistillée. Après une migration de 20 à 22 heures dans le système éthanol-acétate de NH_4 (5:2, v/v), on examine les feuilles à la lumière UV. On distingue deux bandes : la plus rapide correspond à la fraction de cAMP non oxydé tandis que la seconde révèle la présence du N¹-ox-cAMP. La bande de N-oxyde est découpée, réduite en confettis et élue par 150 ml d'eau bidistillée sous agitation pendant 3 heures à 4°C. La bouillie est ensuite filtrée sur verre fritté et l'élution contrôlée par UV. L'éluat est évaporé à

sec puis repris par 10 ml d'eau.

Contrairement à Posternak (23) qui précipite l'acide sous forme de sel de baryum pouvant se montrer gênant vis-à-vis de la PDE, nous avons isolé le produit sous forme **acide**. Pour ce faire, on ajoute du Dowex 50 W x 12, forme H^+ , à la solution jusqu'à obtention d'un pH de 2,5 à 3,0. Le Dowex est filtré et lavé par H_2O à la suite de quoi on évapore la solution à sec. La substance est précipitée par dissolution complète dans 2,5 ml d'eau avec l'aide de NaOH 1 N (pH = 8) et addition de 1 volume d'alcool absolu et une goutte d'acide chlorhydrique concentré (pH $\sim$ 3). On recueille le produit par centrifugation et on le lave deux fois par l'éthanol aqueux 60%, une fois 70% et une fois 80% en contrôlant la neutralité des eaux de lavage, puis trois fois à l'alcool absolu. Sécher sous vide en présence de H_2SO_4 .

Rendement : 76 mg (61%).

Analyse : $C_{10}H_{12}N_5O_7P$ PM = 345,2

Calculé % C 34,79 H 3,50 N 20,29 P 8,97

trouvé % C 34,94 H 3,63 N 20,25 P 8,40

2.5. Etude calorimétrique

2.5.1. Généralités

La calorimétrie est une méthode d'investigation des plus étendues. Quoique relativement ancienne, ce n'est que fort récemment qu'elle a obtenu ses lettres de noblesse. Jusqu'alors elle était mise à contribution pour résoudre des problèmes pratiques d'analyse et de recherche en chimie générale. Son emploi se trouvait limité par la complexité des méthodes expérimentales qu'elle entraînait et, facteur des plus importants, à cause de la quantité considérable de produit qu'elle consommait lors de chaque mesure.

Le progrès de l'électronique a permis la mise au point d'appareils détectant les flux de chaleur et mesurant des variations de températures avec ces sensibilités extrêmes. C'est à eux que la calorimétrie, devenue en cette occasion la microcalorimétrie, doit d'avoir fait son apparition dans les laboratoires des biochimistes, par l'intermédiaire d'instruments commercialisés et d'usage relativement simple; encore faut-il s'entendre sur ce que "simple" veut dire ...

Après les premiers développements appliqués par Evans sur le calorimètre de Calvet (72), le dernier cri de la technique actuelle est représenté par les appa-

reils de Benzinger (45) et de Wadsö (73), très semblables à quelques détails près.

2.5.2. Le microcalorimètre de Wadsö

Le calorimètre de Wadsö a été spécialement conçu pour la mesure des chaleurs de réaction en solution diluée mettant en jeu de faibles volumes. Il est particulièrement approprié pour l'étude des réactions biologiques en solution aqueuse. Il existe en deux versions destinées à des usages différents : Batch et Flow. En "batch", les réactifs sont mélangés en une seule fois par la rotation du calorimètre proprement dit, contenant les cellules de réaction et de référence; le signal, en l'occurrence la tension électrique délivrée par le détecteur est proportionnel au flux de chaleur généré par la transformation chimique. A la fin de celle-ci, la tension retombe à zéro. Dans le système "flow", c'est-à-dire à débit, les réactifs sont constamment renouvelés par apport continu au moyen de pompes à débit régulier. On obtient un signal d'amplitude constante (état stationnaire) tant que les réactifs, de concentration constante, sont injectés dans l'appareil.

Des travaux de nature fort diverse ont déjà été publiés par des auteurs ayant eu recours à cet appareil avec succès. En batch, nous mentionnerons l'étude de Bjurulf concernant les paramètres thermodynamiques d'une liaison enzyme - inhibiteur (74), les chaleurs de réaction entre des polynucléotides de synthèse (75), les effets thermiques des interactions entre les oligosaccharides avec le Sephadex (76), les propriétés microcalorimétriques de la dénaturation du lysozyme (77) et du chymotrypsinogène (78).

En flow, nous citerons la mesure des enthalpies de mélange de divers liquides organiques (Beckman B 190) (79) et la détermination de la vitesse de croissance de certaines bactéries aérobies (80).

2.5.2.1. Principe de fonctionnement

L'appareil est construit par la maison LKB (Suède) et fonctionne comme calorimètre à "flux de chaleur". Le principe de la technique de "flux de chaleur" consiste à diriger le flux thermique, généré par une réaction chimique, dans une enceinte calorifique (ou vice-versa, si la réaction est endothermique). On mesure ce flux de chaleur en le convertissant en différence de potentiel électrique.

Le microcalorimètre est installé dans un bain d'air (50 l) finement thermosta-

tisé. La chaleur libérée ou absorbée par le processus chimique étudié passe de la cellule de réaction à l'enceinte calorifique (ou vice-versa) à travers un détecteur formé par un grand nombre de thermocouples, connectés en série et montés entre la cellule de réaction et l'enceinte calorifique.

La différence de température entre les jonctions des thermocouples induit une tension électrique qui est enregistrée après une amplification adéquate. Dès que la réaction cesse, le calorimètre retrouve graduellement son équilibre thermique initial; la différence de température entre la cellule de réaction et l'enceinte calorifique, de même que le flux de chaleur et par suite de tension de la thermopile redeviennent alors nuls.

Toutefois, les variations enregistrées ne sont pas causées par la réaction chimique seulement. Il s'y ajoute un certain nombre de phénomènes parasites non négligeables parmi lesquels nous citerons les chaleurs dues aux frottements des liquides au cours de la rotation du calorimètre contenant les cellules de réaction et de référence et les changements qui affectent la température extérieure. Pour contrer ces inconvénients, le constructeur a adopté le "principe des jumaux" où deux cellules, l'une remplie avec les réactifs et l'autre avec des produits non réactifs sont entourées de thermopiles, ces dernières étant connectées en opposition. Ainsi la réponse électrique à toutes sortes de flux thermiques tend à s'annuler, exception faite de la chaleur de réaction générée dans une des deux cellules.

2.5.2.2. Caractéristiques techniques

2.5.2.2.1. Conditions de travail

Cet appareil étant très sensible, toute variation de la température du local se répercute immédiatement sur la qualité des résultats. L'intensité du signal électrique dépendant de la valeur du flux de chaleur, nous pouvons, pour une réaction de ΔH donnée, être mis en présence d'une infinité de cas dont les deux extrêmes sont les suivants :

- a) La réaction est lente donc le signal sera faible et durera longtemps. La possibilité de faire la mesure dépend de la sensibilité de l'appareil et de la stabilité des conditions extérieures.
- b) La réaction est rapide, l'amplitude du signal est grande et les conditions extérieures sont beaucoup moins importantes.

Bien entendu, il est préférable de travailler dans le second cas, ce qui n'est de loin pas toujours possible.

A cet effet et pour opérer sur les échelles sensibles de l'appareil, le constructeur prescrit que les variations de température du local ne doivent pas excéder

$$\Delta\theta = \pm 0,5^{\circ}\text{C en 24 heures}$$

D'autre part, l'expérience nous a montré que, pour des réactions de ce type, effectuées à 25°C , la température du local devait être :

$$\theta \approx 19^{\circ}\text{C}.$$

Afin de régulariser plus finement encore l'équilibre thermique de l'appareil, nous avons branché une préthermostatisation à $\theta = 18,5 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$ qui nous donne de bons résultats.

La température du calorimètre proprement dit, conformément à la convention relative à l'état standard, a été réglée une fois pour toutes à

$$\theta = 25 \pm 0,01^{\circ}\text{C}.$$

En outre, l'appareil est muni d'un chauffage d'appoint dont l'intensité est réglable sur trois valeurs différentes. Cet accessoire permet d'accélérer l'établissement de l'équilibre thermique après qu'on a introduit les produits dans l'appareil, ceux-ci ayant une température légèrement inférieure à 25°C .

2.5.2.2.2. Sensibilité

Sur une échelle de $10 \mu\text{V}$, l'appareil détecte normalement un flux de chaleur de $\frac{\Delta Q}{\Delta t} = 12 \mu\text{cal/sec}$.

Toutefois, un débit aussi faible ne peut être enregistré que durant une période limitée à environ une heure. Dans tous les cas, il n'est guère possible de mesurer des chaleurs de réaction inférieures à $Q = 1 \text{ mcal}$.

Les hydrolyses les plus lentes que nous ayons mesurées ont duré cinq à six heures pour un $Q \approx 300 \text{ mcal}$ (cas de la cIMP et du 8-bromo-cIMP). Toutefois, force nous est de reconnaître que la précision des mesures est mauvaise, car la ligne de base, entre autres, est très difficile à repérer. Les conditions expérimentales ne donnent que des chances de réussite assez minces.

2.5.2.2.3. Cellules - Calibrage - Enregistrement du signal

Construites en or 18 crt, les deux cellules sont divisées en deux compartiments de 2 ml et 4 ml respectivement.

Le flux de chaleur détecté par la différence de potentiel E apparaissant aux bornes des thermopiles, est enregistré en fonction du temps; un intégrateur de surface étant mécaniquement lié à l'enregistreur permet un calcul rapide de la surface Δ limitée par la ligne de base et le signal électrique.

$$|\Delta| \Delta = c. \int_t^{t_2} E dt.$$

où les unités de Δ sont comptées en pics $|\Delta|$. Dans notre cas $1 \Delta = 200 \text{ mm}^2$;
 c = constante de proportionnalité.

Pour connaître l'équivalent calorifique du signal enregistré, les deux cellules sont équipées chacune d'une résistance de chauffage indépendante, connectée à une alimentation de courant stabilisé, elle-même solidaire d'un chronomètre. En choisissant un courant i traversant la résistance de calibrage R de la cellule contenant les réactifs, pendant un temps t , la chaleur dégagée dans la cellule vaut :

$$|\text{cal}| Q = \frac{R.i^2.t}{4,184} \quad \text{avec } i \text{ [A]}, t \text{ [Sec]}, R \text{ [\Omega]}$$

A Q , correspond une certaine surface Δ mesurée en pics Δ par l'intégrateur. Si l'on veut connaître la valeur ϵ qui représente sur l'enthalpogramme la quantité de chaleur par unité de surface, alors :

$$|\text{mcal}/\Delta| \epsilon = \frac{Q}{\Delta}$$

En connaissant $\Delta_{\text{réaction}}$, une simple règle de trois permet de calculer $Q_{\text{réaction}}$:

$$|\text{mcal}| Q = \epsilon.\Delta$$

Quant aux calibrages qui doivent toujours suivre une réaction microcalorimétrique, ils sont reproductibles dans une étendue de 1 à 2 % pour une expérience donnée.

2.5.2.2.4. Précision des seringues

Les produits étant introduits dans les cellules à l'aide de seringues, le calibrage de ces dernières a donné les résultats suivants :

2 ml H_2O bidistillée à 20°C donnent une masse moyenne $\bar{m}$ et une variance s^2 :

$$\bar{m}_1 = 1,997 \text{ g} \quad s^2 = 0,002$$

$$\bar{m}_2 = 1,992 \text{ g} \quad s^2 = 0,003$$

calculée sur un nombre de 20 mesures.

La précision est suffisante pour qu'aucune correction ne soit nécessaire. Dans les mêmes conditions les seringues de 5 ml donnent, pour un volume de 4 ml :

$$\bar{m}_1 = 3,986 \text{ g} \quad s^2 = 0,021$$

$$\bar{m}_2 = 3,977 \text{ g} \quad s^2 = 0,025$$

2.5.3. Mesure des enthalpies de réaction

2.5.3.1. Exemple détaillé : Hydrolyse IV du cTMP

2.5.3.1.1. Préparation des réactifs

- On prépare une solution de tampon Tris-HCl 0,1 M, pH 8,3, 8 mM en $\text{Mg}^{2+}\text{SO}_4^{2-}$, 5 mM en mercaptoéthanol.
- On prépare 2,4 ml de substrat à une concentration $[\text{S}] = 7,08 \text{ mM}$.
- On dissout 40 ml d'enzyme lyophilisé dans 11,5 ml du tampon décrit ci-dessus, sous agitation magnétique pendant 10'. On centrifuge le tout pendant 45' à 30000 g et on récupère 10 ml de surnageant bon pour le calorimètre.

2.5.3.1.2. Séquence des opérations-mesure

20 ml de tampon [T], l'enzyme [E] et le substrat [S] sont transportés dans un vase de Dewar à 0°C vers le calorimètre.

La séquence-horaire des opérations est la suivante :

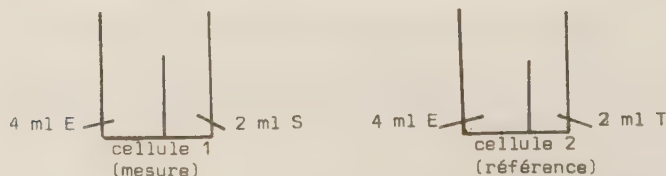
22h15 Arrivée : $\theta_{\text{local}} = 19,5^\circ\text{C}$; $\theta_{\text{préthermostat}} = 18,5^\circ\text{C}$;
 $\theta_{\text{calorimètre}} = 25^\circ\text{C}$.

22h20 Mise en marche du thermostat d'appoint.

22h25 Sortir les produits du Dewar. Rincer les seringues avec le tampon.
 Enclencher l'enregistreur et le fonctionnement des plumes.

22h40 On préthermostatise les produits à 24,5°C dans le thermostat d'appoint pendant 10'.

22h50 Remplissage des seringues (v5') et introduction des produits dans l'appareil (v2') selon le schéma suivant :



c) Enthalpie de la réaction

$$708,5 \sim 143 \text{ mcal} \rightarrow \epsilon = \frac{143}{708,5} = 0,202 \text{ mcal/L}$$

Le sens de la déviation étant positif (exothermique)

$$\rightarrow \Delta H_{\text{réaction}} = - 0,202 \text{ mcal/L} \cdot 1510 = - 305 \text{ mcal.}$$

2 ml de 2'd-c3'5'TMP 7,08 mM, mélangés à 4ml de PDE donnent une solution de 6 ml à $|S| = 2,36 \text{ mM}$.

$$6 \text{ ml} \cdot 2,36 \text{ } \mu\text{mole/ml} = 14,2 \text{ } \mu\text{moles}$$

$$\Delta H = - \frac{3,05 \cdot 10^{-4}}{1,42 \cdot 10^{-5}} = 21,5 \text{ kcal/mole.}$$

2.5.3.2. Résultats

La concentration $|S|$ de chaque produit a été calculée avec précision sur la base des dosages du phosphore ($|S| \approx 2,4 \text{ mM}$).

La concentration de l'enzyme est indiquée dans chaque expérience par son facteur de concentration. L'enzyme dit "normal" est naturel non lyophilisé.

ΔH |mcal| indique l'enthalpie mesurée.

ΔH_g |kcal/mole| indique l'enthalpie de la réaction globale.

En plus, nous avons indiqué l'échelle de sensibilité sur laquelle on a travaillé (30 μV = la plus sensible) et comme précédemment, la variance et l'erreur standard. On a résumé le tout dans le tableau suivant :

Substrat, E, S , échelle	n°	Q mcal	ΔH_g Kcal/mole	s ²
a) cAMP E : normale et conc 2 X Ech : 300 μV et 1 mV S = 2,30 mM	1	- 341	- 24,7	
	2	- 332	- 24,0	
	3	- 338	- 24,5	
	4	- 419	- 23,9	
	5	- 336	- 24,4	
	6	- 339	- 24,6	
	7	- 325	- 23,6	
	8	- 329	- 23,8	
			$\overline{\Delta H} = -24,2$	0,2

b) 8-bromo-cAMP E: conc 1,5 x Ech.: 100 μ V $ S = 2,40$ mV	1	- 298	- 20,7	
	2	- 294	- 20,4	
	3	- 292	- 20,3	
	4	- 294	- 20,4	
	5	- 298	- 20,7	
			$\overline{\Delta H} = - 20,5$	< 0,1
c) cXMP E : conc 4,5 x puis normale Ech.: 300 μ V puis 100 μ V $ S = 2,26$ mV	1	- 318	- 23,4	
	2	- 328	- 24,1	
	3	- 327	- 24,0	
	4	- 324	- 24,6	
	5	- 320	- 23,6	
	6	- 316	- 23,2	
			$\overline{\Delta H} = - 23,8$	0,3
d) 2'-O-déoxy- cAMP E : conc 1,5 x Ech.: 300 μ V $ S = 2,42$ mV	1	- 320	- 22,0	
	2	- 316	- 21,8	
	3	- 324	- 22,3	
	4	- 326	- 22,4	
	5	- 327	- 22,5	
	6	- 324	- 22,3	
	7	- 326	- 22,4	
			$\overline{\Delta H} = - 22,2$	0,1
e) N ¹ -oxyde-cAMP E : normale Ech.: 100 μ V $ S = 2,37$ mV	1	- 306	- 21,6	
	2	- 312	- 22,0	
	3	- 308	- 21,7	
	4	- 313	- 22,0	
	5	- 308	- 21,7	
	6	- 306	- 21,7	
			$\overline{\Delta H} = - 21,8$	< 0,1

f) cGMP E : normale Ech.: 300 μ V $ S = 2,96$ mM	1	- 338	- 19,1	
	2	- 334	- 18,9	
	3	- 340	- 19,2	
	4	- 334	- 18,8	
	5	- 338	- 19,1	
	6	- 338	- 19,1	
			$\overline{\Delta H} = - 19,0$	< 0,1
g) 6-Chloro-pur- Rib-cMP E : conc 1,5 x Ech.: 300 μ V $ S = 2,16$ mM	1	- 296	- 22,8	
	2	Panne d'appareillage		
	3	- 309	- 23,8	
	4	- 302	- 23,3	
	5	- 306	- 23,6	
	6	- 305	- 23,5	
	7	- 306	- 23,6	
			$\overline{\Delta H} = - 23,4$	0,1
h) Ethéno-cAMP E: conc. 3,5 x Ech: 100 μ V $ S = 2,37$ mM	1	- 263	- 18,5	
	2	- 263	- 18,5	
	3	- 264	- 18,5	
	4	- 265	- 18,6	
	5	- 262	- 18,4	
	6	- 264	- 18,5	
			$\overline{\Delta H} = - 18,5$	<< 0,1
i) 2'-O-butyryl- cIMP E: normale Ech: 300 μ V $ S = 2,42$ mM	1	- 334	- 23,0	
	2	- 323	- 22,2	
	3	- 325	- 22,4	
	4	- 329	- 22,6	
	5	- 329	- 22,6	
	6	- 327	- 22,5	
			$\overline{\Delta H} = - 22,55$	0,1

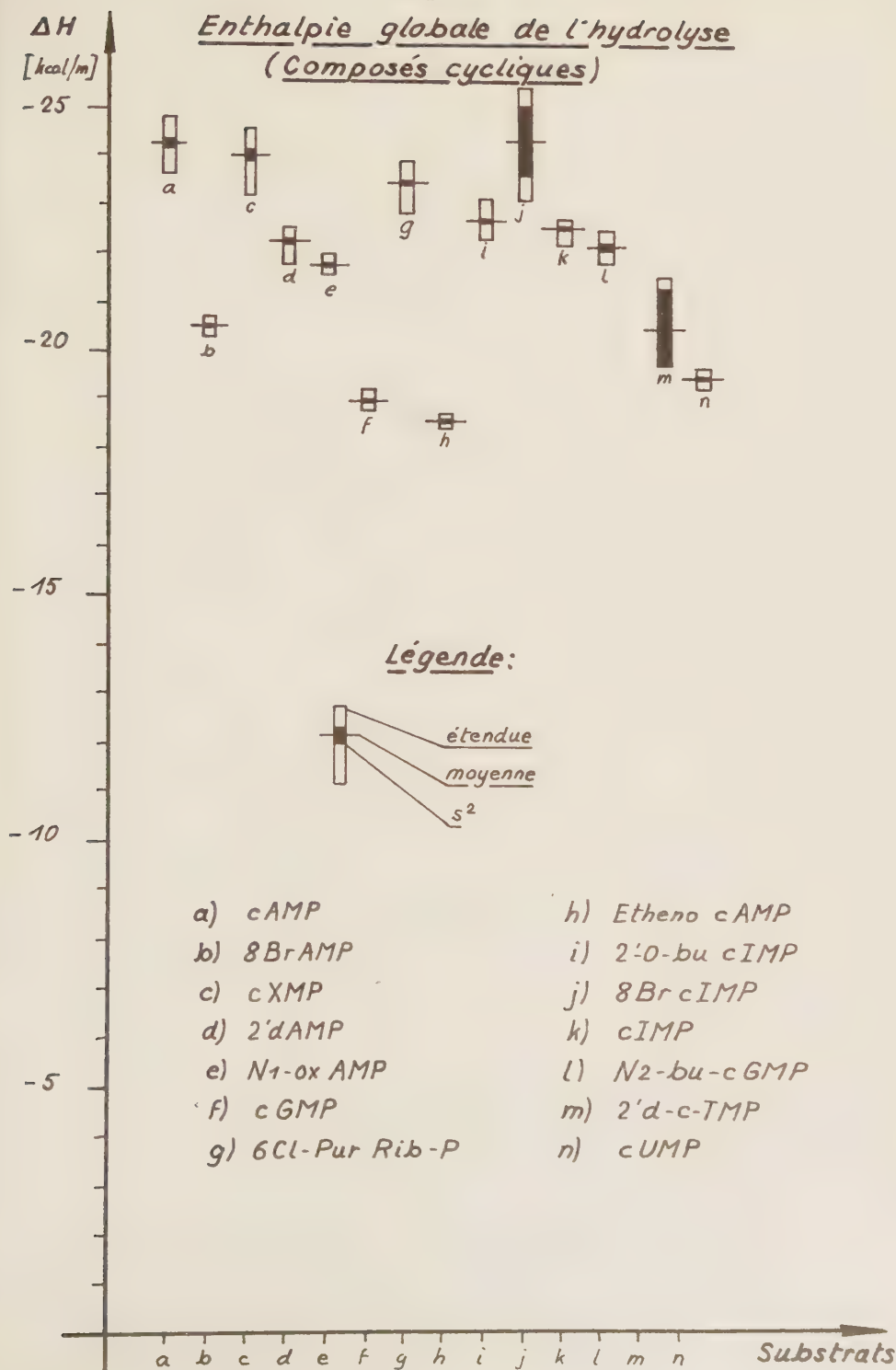
j) 8-Bromo-cIMP E: conc 4 x Ech: 30 μ V $[S] = 2,22 \text{ mM}$	1	- 338	- 25,4	
	2	- 325	- 24,4	
	3	- 307	- 23,0	
	4	- 319	- 24,0	
	5	- 319	- 24,0	
	6	Panne d'intégrateur		
			$\overline{\Delta H} = - 24,2$	0,7
k) cIMP E: normale Ech: 300 μ V $[S] = 2,11 \text{ mM}$	1	- 285	- 22,6	
	2	- 286	- 22,6	
	3	- 283	- 22,4	
	4	- 283	- 22,4	
	5	- 286	- 22,6	
	6	- 280	- 22,1	
			$\overline{\Delta H} = - 22,45$	< 0,1
l) N-2-monobutyryl-cGMP E : conc 1,5 x et 2,5 x Ech: mixte et 300 μ V $[S] = 2,26 \text{ mM}$	1	- 296	- 21,6	
	2	- 300	- 22,1	
	3	- 297	- 21,9	
	4	- 304	- 22,4	
	5	- 304	- 22,4	
			$\overline{\Delta H} = - 22,1$	0,1
m) cTMP E : conc 3,4x Ech: 30 μ V $[S] = 2,36 \text{ mM}$	1	- 279	- 19,7	
	2	- 305	- 21,5	
	3	Panne d'appareillage		
	4	- 296	- 20,8	
	5	- 279	- 19,7	
			$\overline{\Delta H} = - 20,4$	0,8

n) cUMP E: conc 2,3 x Ech: 100 μ V S = 2,57 mM	1	- 308	- 19,25	
	2	- 310	- 19,4	
	3	- 314	- 19,6	
	4	- 308	- 19,25	
	5	Panne d'intégrateur		
	6	- 310	- 19,4	
	7	- 312	- 19,5	
			$\overline{\Delta H} = - 19,4$	<0,1

Remarque : Comme il fallait s'y attendre, les variances les plus considérables apparaissent dans le cas des deux substrats les plus résistants à l'action de la PDE, soit le δ -Bromo-cIMP et le cTMP. Pour les autres produits, la méthode de concentration du ferment était assez simple et efficace pour obtenir des réactions relativement rapides.

Dans trois cas, le cAMP, le cXMP et le N²-monobutyryl-cGMP nous avons travaillé sur diverses échelles de sensibilité avec des enzymes à concentrations différentes ; les résultats nous apprennent que le ΔH global de la réaction ne varie sensiblement en fonction ni de la vitesse de l'hydrolyse ni de la concentration d'enzyme.

Enthalpie globale de l'hydrolyse (Composés cycliques)



2.5.3.3. Analyse de variance simple

La lecture des résultats et l'observation du graphique nous montrent que les chiffres sont groupés dans une gerbe étroite. On peut dès lors se demander si les écarts constatés entre les divers substrats sont significatifs d'une différence de l'enthalpie d'hydrolyse ou s'ils proviennent uniquement d'une dispersion des résultats. Par une analyse de variance simple, la statistique nous permet d'y répondre.

L'analyse de variance ou test du "F" (Fisher) consiste à déterminer, par une méthode de calcul adéquate, l'indépendance d'une série de moyennes observées.

Dans notre cas, chaque $\overline{\Delta H}$ est la moyenne d'une population de résultats numérique pour un traitement donné (en l'occurrence la structure du substrat). Vouloir interpréter les différentes valeurs de $\overline{\Delta H}$ en fonction des traitements, c'est affirmer préalablement que les moyennes sont indépendantes, donc significatives et que leurs différences ne résultent pas de la dispersion des résultats.

Pour ce faire, nous procédons de la manière suivante :

Hypothèse initiale :

$\Delta H_{gi} = X_i$ variable aléatoire de traitement i
 $X_i \sim N(\mu_i, \sigma)$
où μ_i = moyenne pour un traitement i
 σ = écart-type

Hypothèse nulle H_0 à tester :

$H_0 : \mu_i = \mu$ où μ = moyenne générale de tous les traitements

Si $F_{\text{calculé}} < F_{\text{table}} \rightarrow$ on rejette l'hypothèse H_0 avec un seuil de signification de 0,001 pour une erreur de première espèce.

Calcul de F :

On pose : m = nombre de traitements : 14

n = nombre d'éléments de l'échantillon pour un traitement i.

N = nombre d'éléments de l'échantillon (nombre de mesures de

$$\Delta H_g = 82)$$

x_{ij} = jième valeur de X_i au traitement i

$\overline{x_i}$ = valeur moyenne de X pour le traitement i

$\overline{x}$ = valeur moyenne de X pour tous les traitements.

$$T = \sum \sum x_{ij} = 1790,6$$

$$\mu = 21,8366 = \bar{x}$$

$$S_{II}^2 = \frac{\sum (x_{ij} - \bar{x})^2}{m - 1} = 2,179873 \cdot 10^1$$

$$S_I^2 = \frac{\sum n_i \cdot (\bar{x}_i - \bar{x})^2 + \sum (x_{ij} - \bar{x})^2}{N - m} = 1,503195 \cdot 10^{-1}$$

$$F_{\text{calculé}} = \frac{S_{II}^2}{S_I^2} = 1,450 \cdot 10^2 = 145$$

$$F_{0,001 \text{ table}} (13 ; 68) \approx 3 \ll 145$$

→ L'hypothèse H_0 est rejetée; autrement dit les $\overline{\Delta H_i}$ sont significatifs et indépendants. L'erreur est très inférieure à 1%.

2.6. Phénomènes parasites

2.6.1. Généralités

La calorimétrie est une méthode imparfaite car les grandeurs qu'elle nous fournit sont toujours le résultat de réactions globales. Sous ce vocable, on comprend les chaleurs qui proviennent aussi bien de la réaction chimique à étudier que des phénomènes qui l'accompagnent, tels : les effets thermiques dus aux frottements des solutions de réactifs lors de leur mélange, à la dilution des réactifs lors de leur mélange, aux réactions annexes (protonations et déprotonations), aux variations structurales des produits et des réactifs au cours du temps (modifications conformationnelles voire dénaturation des protéines, naissance de liaisons hydrophobes), à la formation de divers complexes etc...

Un des avantages indiscutés du calorimètre du type "jumeaux" consiste justement à supprimer une grande partie de ces effets thermiques indésirables.

Dans notre milieu réactionnel très riche en protéines, on pourrait craindre à juste titre, que des modifications de la structure secondotertiaire de l'enzyme n'entraînent d'importantes erreurs de mesure. Il en est de même pour de très légères variations de la température du thermostat principal ou d'éventuelles interactions entre les réactifs en solution.

A cet égard, nous avons toujours introduit les mêmes réactifs aux mêmes concentrations et dans des volumes égaux dans les deux cellules électriquement et donc thermodynamiquement opposées. A défaut d'élimination absolue, ce schéma opéra-

tionnel nous autorise à attribuer des valeurs négligeables aux facteurs perturbateurs susmentionnés.

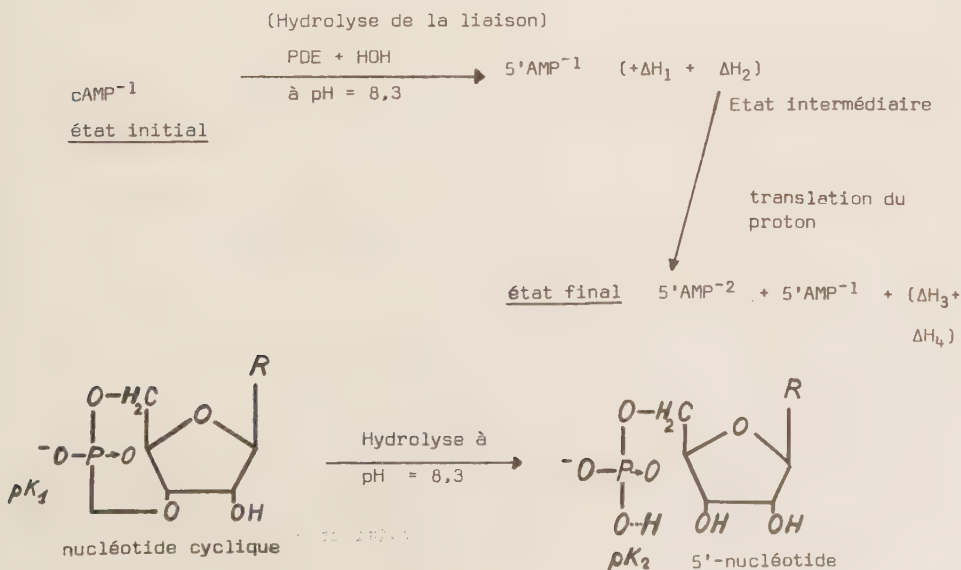
Toutefois, ce qui est acquis pour les réactifs ne l'est pas pour les produits. Comme il se doit, les substrats ne sont introduits que dans une seule des deux cellules; en conséquence, il est mesuré, conjointement à la chaleur d'hydrolyse, une enthalpie de mélange du substrat dans le milieu tampon + enzyme et une enthalpie de protonation réglée par les vertus acido-basiques de la nouvelle fonction acide générée sur le groupe phosphoryle. Ces deux facteurs sont à déterminer, à la suite de quoi on pourra les soustraire des valeurs $\overline{\Delta H}_g$ mesurées précédemment.

2.6.2. Les chaleurs de protonation

C'est une boîte de Pandore ! Ce problème, il faut bien le dire, est des plus scabreux et les auteurs ont proposé des solutions diverses pour le résoudre. Pour bien l'entendre, il faut d'abord bien le poser; ce sera notre premier point après lequel nous examinerons les diverses réponses que Sturtevant et Westheimer y ont données puis, troisième point, nous présenterons nos propres méthodes.

2.6.2.1. Nature de la protonation

A cette fin, réécrivons l'équation chimique telle qu'elle a lieu dans le calorimètre :



où : $\Delta H_{g(\text{global})} = \sum_{n=1}^{n=4} \Delta H_n = \Delta H \text{ mesuré qui se décompose en :}$

$\Delta H_{\text{hydrolyse}}$ = enthalpie due à l'hydrolyse de la liaison phosphodiester; c'est elle qu'on veut calculer.

ΔH_1 = enthalpie due au départ du proton de la seconde fonction acide

ΔH_2 = fixation du proton sur le Tris présent dans le milieu réactionnel.

$(\Delta H_1 + \Delta H_2)$ = chaleur de protonation à déterminer

ΔH_3 = enthalpie due au mélange et à la dilution des produits (cf. paragraphe suivant).

La réaction se passe en deux temps :

Dans une première phase, la liaison diester est hydrolysée; dans une seconde phase, la nouvelle fonction acide se dissocie selon un mode réglé par le pH ambiant et la valeur du pK_2 .

A l'état initial, nous n'avons que du $cAMP^{-1}$; la dissociation de la seule fonction acide du substrat est quantitative à $pH = 8,3$, son pK étant d'environ 3.

En fin de réaction, nous sommes en présence d'un mélange de $5'AMP^{-1}$ (en très faible quantité) et de $5'AMP^{-2}$ en très forte quantité, le pK_2 étant d'environ 6,2. Pour les autres substrats, le pK_2 ne diffère pas dans des limites spectaculaires: $6,05 \leq pK_2 \leq 6,37$.

Il se produit, conséquemment à l'hydrolyse, une dissociation de l'ordre de 99% de la nouvelle fonction acide et la fixation de ce nouveau proton sur un récepteur du milieu réactionnel. Les deux mouvements protoniques entraînent de sérieux bouleversements thermodynamiques dont la détermination est indispensable.

2.6.2.2. Les solutions de Sturtevant, Westheimer et Greengard

2.6.2.2.1. Greengard et Sturtevant

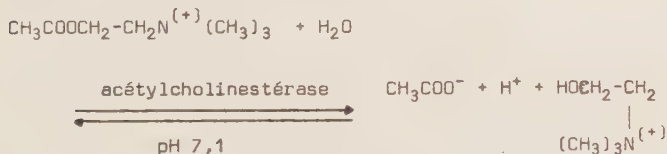
Dans leurs travaux sur les nucléotides cycliques, Greengard et Sturtevant (43,44) mesurent le pourcentage de la dissociation en hydrolysant à nouveau le nucléotide cyclique mais dans un milieu très faiblement tamponné; le pH est maintenu constant au cours de la réaction par servo-contrôle d'un pH-stat. Sur la base des résultats obtenus, ils calculent la chaleur de protonation à l'aide des valeurs qui sont données dans la littérature (Handbook of Biochemistry) pour la protonation du Tris ($\Delta H = - 11,35 \text{ Kcal/mole à } 25^\circ\text{C}$).

Nous ne contestons pas la subtilité de la méthode, mais à côté de ses avantages nous lui trouvons deux défauts, à première vue majeurs. Nous relevons sur le plan positif le fait que la détermination de ces chaleurs de protonation utilise les mêmes substrats et les mêmes enzymes que l'hydrolyse calorimétrique. Indéniablement, cette polyvalence dans l'emploi des substrats représente un gain de temps et d'argent considérable. Cependant, tout enzyme modifie son comportement en fonction du milieu d'incubation. Bien que dans cette seconde série d'expériences, les paramètres essentiels du pH et de la température soient certainement conservés, la suppression du milieu tamponné, même à force ionique théoriquement reproduite à l'aide d'autres sels, entraîne, qu'on le veuille ou non, des perturbations quant au fonctionnement du ferment. De plus, la mise au point de ce genre d'expérience est souvent fort délicate; nous en avons personnellement fait l'expérience, au prix fort ! De cela, Greengard ne souffle pas un mot.

Sur le plan thermodynamique, nous soulevons respectueusement une question de principe. Qu'en est-il de ce que nous avons appelé le ΔH ? Un détail encore; qui nous dit que les protons qui abandonnent le 5'-nucléotide⁻¹ vont se fixer sur le Tris uniquement ? Il y a dans le milieu d'incubation tout un mélange complexe contenant des protéines en grand nombre; rien ne permet d'affirmer que ces dernières ne fixent pas, elles aussi, des protons. Lorsqu'on l'examine soigneusement, cette méthode n'apparaît pas comme idéale.

2.6.2.2.2. Sturtevant

Dans son étude sur l'enthalpie de l'hydrolyse de l'acétylcholine (81), Sturtevant a plus de chance car l'acide acétique, produit de réaction, est quantitativement dissocié au pH réactionnel (7,1) :



Travaillant en milieu phosphate et se fondant sur les chaleurs de protonation indiquées par Beres (résultats non publiés, cités dans (81)), il a calculé le ΔH_{prot} . Mais dans ce cas également, il passe sous silence l'influence du ferment sur la thermodynamique de la protonation.

2.6.2.2.3. Westheimer et Sturtevant

L'auteur a déterminé l'enthalpie d'hydrolyse de groupes phosphodiesteres simples à l'aide d'une PDE extraite d'Enterobacter aerogenes (82). Dans ce cas, il mesure les pH de ses produits par titration acido-basique; ce paramètre lui permet de calculer la constante de dissociation au pH de travail et, connaissant l'enthalpie de protonation de son tampon (Tris ou Pipes) d'obtenir les corrections désirables. Ici encore, la méthode, aussi soigneuse soit-elle, ne tient pas compte de l'influence du ferment sur les échanges thermiques de la protonation. De plus, si la mesure des pK est relativement accessible sur le plan expérimental, les valeurs absolues que l'on obtient donnent lieu à des interprétations très discutables.

2.6.2.3. Méthode personnelle

Les processus expérimentaux que nous venons de décrire comportant des complications, il nous est apparu nécessaire d'élaborer une nouvelle méthode. Celle-ci devrait faire appel aux appareils dont le comportement était satisfaisant dans le cours des expérimentations antérieures tout en comblant au moins une des lacunes relevées ci-dessus.

A cette fin, considérons une fois encore notre système de réaction :

A l'état initial : La première fonction acide du nucléotide cyclique est quantitativement dissociée ($pK \approx 3$)

A l'état final : Dans un milieu fortement tamponné en Tris-HCl 0,1 M, de pH = 8,3, se trouve comme produit de réaction un 5'-nucléotide avec deux fonctions acides : la première a un $pK_1 \approx$ au pH = 8,3, elle est, comme ci-dessus, complètement dissociée; donc de ce côté-là, pas de problème de protonation. La seconde est "presque" quantitativement dissociée; ici presque veut dire à 98 - 99%. Un proton est donc parti de cette nouvelle fonction acide pour aller se fixer à un composant de la solution réactionnelle.

A ce stade, posons-nous deux questions :

- La quantité de protons expulsés du 5'-nucléotide formé étant dépendante du pK_2 , ce facteur varie-t-il suivant la nature du 5'-nucléotide incriminé, et si oui, dans quelle mesure ?
- Pouvons-nous reproduire, dans le calorimètre, une réaction permettant de mesurer uniquement l'enthalpie de protonation ?

Répondre à ces deux questions, c'est résoudre notre problème. Les deux paragraphes qui suivent en sont l'objet.

2.6.2.3.1. Détermination des pK

Vouloir déterminer un pK c'est, entre autres, titrer un acide par une base et interpréter les courbes de neutralisation obtenues. Voilà ce que nous avons fait selon le mode expérimental décrit ci-dessous.

Mode expérimental

On prépare les réactifs suivants :

- NaOH 0,1 N Merck (Titrisol) ($\mu = 0,1$)
- HCl 0,1 N Merck (Titrisol) ($\mu = 0,1$)
- NaCl 0,1 M Merck pro anal. ($\mu = 0,1$)
- Les substrats 5 mM sont dissous dans le NaCl 0,1 M.
- Les 5'-nucléotides sous forme acide sont directement titrés par la soude caustique.
- Les 5'-nucléotides sous forme de sel sont soit
 - a) passés sur résine Dowex 50, isolés sous forme acide et titrés comme ci-dessus,
 - b) titrés en retour par HCl après adjonction de NaOH 0,1 N.

Appareillage

- Une microélectrode Beckman en verre
- une mini-cellule (5 ml) à manchon pour thermostatisation à 25°C
- une miniburette de précision ($\pm 0,1 \mu\text{l}$) d'une contenance de 500 μl
- un pH-mètre digital, modèle Metrohm E 500 (précision $\pm 0,02 \text{ pH}$)

La séquence des opérations est réglée comme suit :

- pipetage de 2 ml du substrat 5 mM, introduit dans la cellule.
- mise en place de l'électrode (étalonnage préliminaire avec tampon Merck pH = 4 et pH = 7) et agitation par N₂ séché par lavage au H₂SO₄.
- Mise en place de la microburette et titrage par addition de 2,5 ou 5,0 μl de réactif. Attente de 10" et lecture du pH.

Pour chaque substrat, la courbe de neutralisation est relevée deux à trois fois avec un nombre de 90 à 120 points. On obtient des familles de courbes séparées par des différences maximum de 0,03 pH.

La réponse de l'électrode a été préalablement testée par relevé de la courbe de neutralisation du HCl par le NaOH.

Les résultats ont été interprétés graphiquement et par calcul sur ordinateur CDC 3800 du centre de calcul électronique de l'Université, selon un programme MALIK. Ils se recouvrent à $\pm 0,04$ pH.

Ainsi, nous pouvons raisonnablement affirmer que les pK sont déterminés, dans les conditions expérimentales présentes, avec une précision de $\pm 0,04$ pH.

Les résultats sont les suivants :

Substrat	pK ₂ $\pm 0,04$	Substrat	pK ₂ $\pm 0,04$
5'AMP	6,22	6-Cl-Pur-rib-5'-MP	6,22
2'-d-5'AMP	6,29	2'-O-Bu-5'IMP	-
N ¹ -ox-5'-AMP	6,22	5'-GMP	6,30
8-Br-5'-AMP	6,37	5'-XMP	6,05
Ethéno-5'-AMP	6,28	5'-UMP	6,26
5'-IMP	6,26	5'-TMP	6,31
8-Br-5'-IMP	-	N ² - Bu-5'-GMP	-

Remarques

- Sur 14 substrats testés au microcalorimètre, nous en avons obtenus 11 à l'état de 5'-nucléotides.
- Sur les pK₂ de 11 produits, 7 ont été calculés par ordinateur.
Le cas échéant, le pK indiqué est la moyenne entre le pK de l'ordinateur et le pK graphique.

Commentaire

La seconde ionisation des nucléotides a été l'objet de nombreux travaux. En vue d'accorder à nos résultats une signification adéquate, il vaut la peine d'explorer la bibliographie y relative. L'étude très sérieuse de Rutman (83) (par potentiométrie) nous donne de précieux renseignements quant à la variation du pK en fonction de différents paramètres.

Aussi bien pour l'ATP, l'acide orthophosphorique, l'ADP que pour le 5'-AMP, le pK₂ varie en raison de la force ionique μ de la solution. Dans les tables usuelles, on indique systématiquement la valeur du pK₂ à $\mu = 0$ par interpolation sur de nombreuses mesures à μ décroissant.

La publication susmentionnée donne les valeurs suivantes :

μ	0	0,01	0,1	0,6
$pK_2(5'-AMP)$	6,67	6,53	6,47	6,45

Dans notre cas, $pK_2(5'-AMP) = 6,22$ à $\mu = 0,1$. Nous enregistrons donc une différence de 0,25 pH.

Deux ans plus tard, Rutman (84) étudie d'autres nucléotides, notamment des composés mono-, di- et tri- phosphorylés de l'adénosine, la guanosine, l'uridine, la cytosine, l'inosine et la déoxyadénosine. Tous ces substrats suivent une variation analogue à celle vue à propos du 5'-AMP.

Relevons à titre indicatif que les pK augmentent avec la température et que les 5'-mononucléotides donnent les pK_2 suivants (à $\mu = 0$).

Substrat	5'-AMP	2'-c-5'AMP	5'-GMP	5'-IMP	5'-CMP	5'-UMP
$pK \pm 0,02$	6,67	6,65	6,66	6,66	6,62	6,63

De son côté, Alberty (85), en 1951 déjà, a également déterminé le pK_2 de l'AMP, de l'ADP et de l'ATP, en procédant par titration pH-métrique (électrode de verre et pH-mètre Cambridge). Il trouve à 25°C et à $\mu = 0,15$, le résultat suivant :

$$pK_2(5'-AMP) = 6,05$$

Ces chiffres sont intéressants en ce qu'ils montrent que les valeurs obtenues, si elles sont parfaitement reproductibles pour une méthode donnée, subissent des variations indiscutables selon la nature de la technique employée.

Ainsi, nos chiffres sont situés entre ceux de Rutman et ceux d'Alberty. Comme l'un et l'autre sont des spécialistes en ce domaine, nous nous permettons d'observer la plus stricte neutralité quant à la raison ou à l'erreur.

Un renseignement supplémentaire peut être retiré des mesures de Rutman. L'étendue des pK_2 des substrats suivants est égale à

$$e = 0,04 |pH| \text{ pour AMP, dAMP, GMP, IMP, UMP.}$$

Le même paramètre, extrait de nos mesures donne :

$$e' = 0,08 \text{ [pH]}$$

Comme Rutman admet une précision de $\pm 0,02 \text{ [pH]}$ pour ses pK et nous de 0,04 [pH] pour les nôtres, il n'est pas étonnant, a posteriori, que le même rapport caractérise les différences de pK relevées entre nos divers substrats.

Ceci étant dit et puisque nous ne pouvons pas accorder une confiance illimitée aux valeurs absolues de nos résultats, il faut remarquer que, tenant compte des multiples petites variations expérimentales d'un substrat à l'autre, l'étendue des résultats, pour les 11 produits examinés, se monte à :

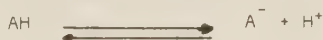
$$e'' = 0,32 \text{ [pH]}$$

et si l'on ne tient compte ni du 8-bromo-5'-AMP ni du 5'-XMP

$$e''' = 0,09 \text{ [pH]}$$

Regardons maintenant à quelles valeurs de la constante de dissociation correspondent ces chiffres.

La dissociation d'un acide répond à la formule suivante :



$$K_{\text{éq}} = \frac{[\text{A}^-] \cdot [\text{H}^+]}{[\text{AH}]}$$

$$[\text{H}^+] = K_{\text{éq}} \frac{[\text{AH}]}{[\text{A}^-]}$$

Cas particulier :

$$\text{Si } \frac{[\text{AH}]}{[\text{A}^-]} = 1 \rightarrow K_{\text{éq}} = K_a = [\text{H}^+]$$

$$\Rightarrow [\text{H}^+] = K_a \cdot \frac{[\text{AH}]}{[\text{A}^-]}$$

$$\text{pH} = \text{pK}_a + \log_{10} \frac{[\text{A}^-]}{[\text{AH}]}$$

Cette relation est valable en première approximation pour une température donnée, à force ionique constante, pour des solutions étendues.

Le calcul des fractions d'acide ou de base en fonction du pH et du pK_a donne les valeurs suivantes :

pH	$[A^-], [AH]$	Fraction base ou acide (%)
$pK_a + 0$	1	50 / 50
$pK_a + 0,16$	1,5	60 / 40
$pK_a + 0,37$	2,3	70 / 30
$pK_a + 0,60$	4,0	80 / 20
$pK_a + 0,95$	8,9	90 / 10
$pK_a + 1,30$	19,9	95,1 / 4,9
$pK_a + 1,50$	31,6	96,8 / 3,2
$pK_a + 1,70$	50,1	98,04 / 1,96
$pK_a + 1,93$	83,1	98,81 / 1,19
$pK_a + 2,0$	100	99,0 / 1,0
$pK_a + 2,06$	120	99,18 / 0,82
$pK_a + 2,15$	141	99,30 / 0,70
$pK_a + 2,25$	175	99,44 / 0,56
$pK_a + 2,40$	251	99,60 / 0,40

La différence de dissociation de nos acides peut être déterminée en tenant compte des deux pK extrêmes obtenus soit :

	pK_a	$pH - pK_a$	% Base/Acide
8-Br-5'AMP	6,37	1,93	98,8/1,19
5'XMP	6,05	2,25	99,4/0,56

La variation de la quantité de H^+ fournie par nos différents substrats, si l'on en croit ces calculs élémentaires et les chiffres issus de nos mesures, n'affectera qu'une portion de

$$\Delta [H^+] \approx 0,7 \text{ \%}.$$

La différence de ΔH induite par fixation éventuelle de ce mini-pourcentage de protons sur le Tris vaut :

$$\Delta H = - 11,35 \text{ kcal/mole} \cdot 0,007 = 0,08 \text{ kcal/mole}$$

(valeur mesurée par de nombreux physicochimistes)(86, 87, 88, 89).

Ce chiffre représente l'erreur introduite dans les résultats si l'on néglige les différences de pK_a frappant les divers substrats. Compte tenu de la précision de nos mesures calorimétriques et des nombreux facteurs aléatoires indéterminés qui hypothèquent l'expérience, nous acceptons le risque de cette approximation.

En conséquence, nous répondons à la question a) en considérant que le comportement acide-basique des substrats est pratiquement le même, dans nos conditions expérimentales, pour tous nos produits.

2.6.2.3.2. Mesures calorimétriques de la protonation

Considérons une expérience microcalorimétrique, les liqueurs étant réparties de la manière suivante :

	Cellule 1 (réaction)	Cellule 2 (référence)
Compartment 1	4 ml PDE normale, pH = 8,3, dans Tris-HCl 0,15 N 5 mM mercaptoéthanol, 8 mM Mg^{2+}	4 ml PDE idem
Compartment 2	5'AMP 7,5 mM Tris 7,5 mM Mg^{2+} 8 mM 2 ml	HCl 7,5 mM Tris 7,5 mM Mg^{2+} 8 mM 2 ml

Avant la réaction, les produits se trouvent dans l'état suivant :

a) Cellule 1 (Compartment 2)

15 μ moles de 5'-AMP⁻¹, le premier proton étant quantitativement neutralisé par 15 μ moles de Tris. La présence de Mg^{2+} garantit la formation préalable du complexe substrat - Mg^{2+} .

b) Cellule 2 (Compartment 2)

15 μ moles de HCl quantitativement neutralisés par 15 μ moles de Tris.

c) Cellules 1 et 2 (Compartment 1)

4 ml de PDE en suspension dans du tampon 0,15 N au lieu de 0,1 N précédemment.

Après la rotation du tambour, les produits sont mélangés et le ΔH enregistré correspond à la transformation chimique dont l'état final est le suivant :

d) Cellule 1

15 μ moles de 5'-AMP dont 99% sous forme de 5'-AMP⁻² et 1% sous forme de 5'-AMP⁻¹ à pH = 8,3.

Le Tris se trouve en concentration 0,1 M.

e) Cellule 2

Même état que précédemment (b); le Tris reste protoné. La concentration en Mg^{2+} reste la même que dans toutes les expériences d'hydrolyse microcalorimétrique. L'enthalpie de mélange du Tris compense celle de la cellule 1. Quant aux ions Cl^- , ils ont une chaleur de mélange négligeable due probablement au fait qu'ils sont également présents dans le compartiment de PDE (provenant du tampon Tris - H^+Cl^-).

L'expérience nous permet de mesurer $\Delta H_m = \Delta H_1 + \Delta H_2 + \Delta H_3$ où

ΔH_1 : le départ à 99% de 15 μ moles de H^+ provenant du 5'-AMP⁻ qui devient ainsi le 5'-AMP⁻²

ΔH_2 : fixation du proton migrateur sur une base présente dans le milieu (Tris ou protéine)

ΔH_3 : la chaleur issue du mélange du 5'-AMP dans le milieu tamponné (variation de la concentration de 5'-AMP qui de 7,5 mM passe à 2,5 mM).

Les enthalpies $\Delta H_p = \Delta H_1 + \Delta H_2$ représentent la correction réelle due à la chaleur de protonation. En effet, au cours des expériences d'hydrolyse, l'état initial des nucléotides cycliques postulait l'existence d'une fonction quantitativement dissociée, c'est bien notre cas ici. Les états finals aussi bien dans les mesures d'hydrolyse que dans le cas ci-dessus sont rigoureusement identiques: le 5'-nucléotide se trouve dans une liqueur fortement tamponnée 0,1 M en Tris-HCl à pH = 8,3, 25°C, 8 mM en Mg^{2+} .

Toutefois, au ΔH_m mesuré ici, il faut encore soustraire le ΔH_3 numériquement égal à la chaleur de dilution du substrat.

En vue d'éviter des surcharges inutiles, nous indiquerons les résultats après avoir traité les chaleurs de dilution.

2.6.3. Les enthalpies de mélange

En vertu des multiples arguments déjà développés, les enthalpies de mélange, les plus simples à mesurer, nous ont, comme il se doit, réservé des surprises.

2.6.3.1. Nucléotides cycliques

Le processus expérimental est le suivant :

	Cellule 1 (réaction)	Cellule 2 (référence)
Compartiment 1	4 ml Tampon, milieu habituel, pH = 8,3	4 ml Tampon habituel pH = 8,3
Compartiment 2	15 μ moles de substrat dissous dans tampon habituel } 2 ml	2 ml tampon habituel

Par cette méthode, on mesure uniquement le ΔH_3 de dilution, généré par le mélange du nucléotide cyclique; sa concentration passe de $|S| = 7,5 \text{ mM}$ à $|S| = 2,5 \text{ mM}$. Les conditions de travail sont sensiblement les mêmes que pour nos mesures d'hydrolyse. L'échelle de l'amplificateur est de $30 \mu\text{V}$; mais comme la réaction est très rapide, l'expérience ne présente pas de difficultés insurmontables.

Les résultats sont les suivants :

Substrat	$\Delta H_3 \text{ [mcal]}$	$\Delta H_3 \text{ [kcal/mole]}$
a) cAMP (Endothermique)	1,93	0,13
	1,63	0,11
	1,75	0,12
	1,58	0,11
	1,82	0,12
		$\overline{\Delta H} = 0,12$
b) 8-Bromo-cAMP (Endothermique)	< 1 mcal	< 0,06
c) cXMP (Endothermique)	< 1 mcal	< 0,03

d) 2'-déoxy-cAMP (Endothermique)	2,28	0,15
	2,10	0,14
	1,67	0,11
	1,93	0,13
	1,90	0,13
		$\overline{\Delta H} = 0,13$
e) N ¹ -oxyde-cAMP (Endothermique)	1,53	0,10
	1,43	0,10
	1,42	0,09
	1,27	0,08
	1,29	0,09
		$\overline{\Delta H} = 0,09$
f) cGMP (Endothermique)	< 1 mcal	< 0,02
g) 6-Chloro-pur-rib- 3'5'MP (Endothermique)	< 1 mcal	< 0,06
h) Ethéno-cAMP (Endothermique)	4,58	0,33
	4,46	0,30
	3,25	0,22
	3,36	0,22
	3,53	0,24
		$\overline{\Delta H} = 0,26$
i) 2'-O-butyryl-cIMP (Exothermique)	< 1 mcal	< 0,03

j) 8-Bromo-cIMP (Exothermique)	- 3,68	- 0,25
	- 3,33	- 0,22
	- 3,48	- 0,23
	- 3,33	- 0,22
	- 3,40	- 0,23
		$\overline{\Delta H} = - 0,23$
k) cIMP (Exothermique)	- 3,45	- 0,23
	- 3,33	- 0,22
	- 2,93	- 0,20
	- 3,13	- 0,21
	- 3,19	- 0,21
		$\overline{\Delta H} = - 0,21$
l) N ² - monobutryl- cGMP (Endothermique)	< 1 mcal	< 0,02
m) cTMP (Endothermique)	< 1 mcal	< 0,04
n) cUMP (Exothermique)	< -1 mcal	< 0,04

Ainsi, nous avons trois substrats qui donnent des enthalpies de mélange exothermiques dont deux ne sont pas négligeables (8-bromo-cIMP et cIMP). Nous remarquons que six substrats sur les 14 qui ont été testés manifestent à la dilution une enthalpie non négligeable quoique faible. Nous en tiendrons compte dans le calcul des ΔH d'hydrolyse en les soustrayant des valeurs obtenues sous 2.5.3.2.

2.6.3.2. Les nucléotides non cycliques

Nous indiquons dans le tableau ci-dessous les enthalpies ΔH_3 concernant les 5'-nucléotides qui ont été utilisés lors de la détermination des chaleurs de protonation selon la description donnée au paragraphe 2.6.2.3.2. soit les

5'-AMP, 5'-GMP, 5'-IMP, 5'-UMP et 5'-XMP

La répartition est la même que précédemment sauf qu'on introduit 4 ml de PDE dans les deux compartiments No. 1.

Substrat	ΔH_3 [mcal]	ΔH_3 [Kcal/mole]
5'-AMP (Endothermique)	1,80	0,12
	1,84	0,12
	1,97	0,13
	1,86	0,12
	1,73	0,11
		$\overline{\Delta H} = 0,12$
5'-GMP (Endothermique)	< 1 mcal	$\sim 0,03$
5'-IMP (Endothermique)	< 1 mcal	$\sim 0,03$
5'-UMP (Endothermique)	1,55	0,10
	1,85	0,11
	1,46	0,10
	1,55	0,10
	1,65	0,11
		$\overline{\Delta H} = 0,10$
5'-XMP (Endothermique)	< 1 mcal	$\sim 0,02$

Nous ne tiendrons compte dans nos corrections que des valeurs obtenues pour le 5'-AMP et le 5'-UMP.

2.6.4. Corrections définitives (chaleurs de protonation)

Dans le tableau qui suit, nous présentons

- a) les chaleurs de protonation mesurées $\Delta H_1 + \Delta H_2 + \Delta H_3 = \Delta H_m$
- b) les chaleurs de dilution ΔH_3
- c) la soustraction qui donne $\Delta H_p = (\Delta H_1 + \Delta H_2) - \Delta H_3$ représentant, tous facteurs étant corrigés, la valeur à soustraire des chiffres obtenus sous 2.5.3.2.

Substrat	$\Delta H_m = \Delta H_1 + \Delta H_2$			ΔH_3	$\Delta H_p = \Delta H_m - \Delta H_3$
	mcal	Kcal/mole	s ²		
5'-GMP (1 mV)	- 161	- 10,7			
	- 171	- 11,4			
	- 170	- 11,3			
	- 158	- 10,5			
	- 167	- 11,1			
		$\overline{\Delta H_m} = - 11,0$	0,15	négl.	- 11,0
5'-IMP (1 mV)	-165	- 11,0			
	-172	- 11,5			
	-168	- 11,2			
	-173	- 11,5			
	-163	- 10,9			
		$\overline{\Delta H_m} = - 11,2$	0,1	négl.	- 11,2
5'-AMP (1 mV)	- 158	- 10,5			
	- 160	- 10,7			
	- 160	- 10,7			
	- 153	- 10,4			
	- 164	- 10,9			
	- 170	- 11,3			
		$\overline{\Delta H_m} = - 10,7$	0,14	+ 0,1	- 10,8

5'-UMP (1 mV)	- 171	- 11,4			
	- 161	- 10,7			
	- 150	- 10,5			
	- 165	- 11,0			
	- 170	- 11,3			
		$\overline{\Delta H}_m = - 11,0$	0,15	+ 0,1	- 11,1
5'-XMP (1 mV)	- 171	- 11,4			
	- 154	- 10,3			
	- 151	- 10,1			
	- 159	- 11,3			
	- 163	- 10,9			
		$\overline{\Delta H}_m = - 10,8$	0,31	négl.	- 10,8

La moyenne des corrections pour les 5 substrats s'élève à :

$$\overline{\Delta H}_p = - 10,98 = - 11,0 \text{ [kcal/mole]}$$

C'est la valeur que nous retrancherons des autres $\Delta H_{\text{hydrolyse}}$ non mesurées ci-dessus.

Nous constatons que le ΔH_p est légèrement inférieur à une protonation de 99% de Tris qui aurait donné :

$$\Delta H_{\text{Tris}} = 0,99 \cdot (-11,35) = - 11,22 \text{ Kcal/mole}$$

Toutefois, il faut tenir compte de la chaleur d'ionisation des 5'-nucléotides qui est donnée par Rutman (84) pour quelques substrats. En additionnant ces valeurs de ΔH_1 à celle de ΔH_2 calculée plus haut, nous obtenons la gamme des valeurs suivantes :

Substrat	$\Delta H_1 \pm 0,4$ [kcal/mole]	ΔH_2 [kcal/mole]	ΔH [kcal/mole]
5'-AMP	- 0,85	- 11,22	12,07
5'-GMP	- 1,45	- 11,22	- 12,67
5'-IMP	- 1,43	- 11,22	- 12,65
5'-UMP	- 1,12	- 11,22	- 12,34

L'étendue de la correction ΔH_p pour ces quelques substrats se monte à :

- 12,07 à - 12,67, avec une moyenne de :

$$\overline{\Delta H_p} = -12,43 \approx -12,4 \text{ kcal/mole}$$

et un battement de $\pm 0,3$ kcal/mole.

L'erreur que nous admettons sur les chaleurs de protonation est de $\pm 0,2$ kcal/mole. Bien que ce battement ne recouvre qu'imparfaitement celui obtenu par calcul, il est probable que, nos conditions expérimentales étant très particulières, les ΔH_1 induits par le départ du proton H^+ sont compensés par d'autres erreurs inhérentes à la méthode.

De toute manière, nos corrections personnelles prouvent que le proton libéré ne va pas uniquement se fixer sur le Tris et qu'il est ainsi hautement improbable d'obtenir un $\Delta H_p = -12,4$ kcal/mole. Notre correction moyenne $\overline{\Delta H_p} = 11,0$ kcal/mole se rapproche des valeurs calculées sans tenir compte de ΔH_1 . Si nous avons procédé de cette façon, les chiffres de ΔH_p étant du même ordre de grandeur que les nôtres, nous aurions atteint des résultats finals semblables mais par une voie fausse. On osera tout de même dire que nos prédécesseurs ont bénéficié d'une chance plutôt énorme.

2.6.5. Résultats définitifs

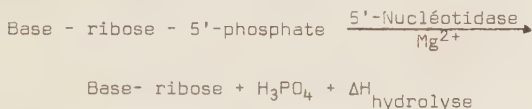
Nous pouvons maintenant donner un tableau des résultats qui nous paraissent scientifiquement valables.

Enthalpie d'hydrolyse des nucléotides cycliques

Substrat	ΔH_{global} kcal/mole	ΔH_{prot} kcal/mole	$\Delta H_{\text{dilution}}$ kcal/mole	$\Delta H_{\text{hydrolyse}} \pm 0,3$ kcal/mole
cAMP	- 24,2	- 10,8	+ 0,1	- 13,5
8-Br-cAMP	- 20,5	- 11,0	-	- 9,5
cXMP	- 23,8	- 10,8	-	- 13,0
2'-d-cAMP	- 22,2	- 11,0	+ 0,1	- 11,3
N ¹ -ox-cAMP	- 21,8	- 11,0	+ 0,1	- 10,9
cGMP	- 19,0	- 11,0	-	- 8,0
8-Cl-Pur-rib-cMP	- 23,4	- 11,0	-	- 12,4
Ethéno-cAMP	- 18,5	- 10,0	+ 0,3	- 7,8
2'-O-Bu-cIMP	- 22,55	- 11,0	-	- 11,5
8-Br-cIMP	- 24,2	- 11,0	- 0,2	- 13,0
cIMP	- 22,45	- 11,2	- 0,2	- 11,0
N ² -méto-Bu-cGMP	- 22,1	- 11,0	-	- 11,1
cTMP	- 20,4	- 11,0	-	- 9,4
cUMP	- 19,4	- 11,1	-	- 8,3

3. 5'-NUCLEOTIDES

Par analogie, nous avons appliqué la méthode microcalorimétrique aux dérivés du 5'-AMP pour déterminer les enthalpies d'hydrolyse de la liaison 5'-phosphate. D'une manière générale, on peut exprimer l'équation chimique comme suit :



Une bonne partie des problèmes inhérents à cette étude a été débrouillée dans la recherche précédente. Nous aurons constamment la possibilité de nous y référer. Cependant, nous allons discuter les questions spécifiques à cette classe de produits en insistant sur les chaleurs de protonation.

Commençons par une brève présentation de la 5'-nucléotidase. Le propos suivant nous entretiendra des cinétiques d'hydrolyse après quoi nous présenterons nos substrats avant de passer à l'étude calorimétrique. Enfin, nous examinerons attentivement la manière dont nous allègerons, autant que faire se peut, les impedimenta alourdissant les enthalpies globales.

3.1. La 5'-nucléotidase

Ici, pas de spectaculaires aventures zoologiques. Les 5'-nucléotidases les plus actives proviennent du venin de serpent. Pour le plus grand bien du soussigné, l'enzyme est commercial. Elever des rats, passe encore, mais des serpents ... Les produits vendus par la maison Sigma ont des activités satisfaisantes. La protéine est livrée sous forme lyophilisée par extraction à partir du venin de *Crotalus adamanteus*. Mais avant d'en parler, examinons la littérature concernant cet enzyme.

3.1.1. Propriétés générales

A l'instar de la PDE, la 5'-nucléotidase a été découverte en de fort nombreux tissus. Le Japonais Naito (90) décrit son isolement à partir des microsomes extraits du foie de poulet. On en a également isolé du foie (91) et du cerveau (95) de rat ainsi que de certains microorganismes comme les Streptomyces (92) ou le Clostridium sticklandii (93). Le venin de serpent en contient beaucoup et c'est de là que proviennent la plupart des préparations commerciales (94). La majorité des enzymes mentionnés ont une action maximum au pH $\approx$ 8,5 - 9,5. Le ferment est soit activé soit inhibé par les substances classiques et subit une dénaturation à une température de 50°C. La spécificité varie en fonction du ferment. Citons les valeurs relatives obtenues par Kluge (95) pour trois

substrats :

Substrat	v_{rel}
5'-AMP	2
5'-GMP	1
5'-IMP	0,8

Certains chercheurs travaillent actuellement à la séparation des isoferments. On connaît les résultats publiés par Hardonk (91) sur les deux isoenzymes d'une 5'-nucléotidase extraite du foie de rat.

3.1.2. Tests préliminaires

3.1.2.1. Résistance à la thermostatisation

3.1.2.1.1. Première expérience

Comme pour la PDE, il faut connaître la résistance de l'enzyme vis-à-vis de la préthermostatisation à 25°C durant 60 à 90 minutes dans le calorimètre.

On utilise la 5'-nucléotidase Sigma N°8877 à 10 u/mg. 1 unité $|U|$ hydrolysant 1 μ mole de 5'-AMP en une minute à pH = 9,0, à 37°C (la force ionique du milieu d'incubation n'est pas précisée). Les premières mesures ont eu lieu dans les conditions suivantes :

$$v = 3,33 \text{ u/ml}$$

$$[S]_{5'-AMP} = 5,24 \text{ mM}$$

Tampon Tris-HCl 0,1 N, pH = 8,3, 8 mM en Mg^{2+}

Schéma de principe

- 100 μ l de nucléotidase sont thermostatisés pendant 0', 6'30", 11', 22', 30', 45', 60', 90'.
- Ajouter 200 μ l de 5'-AMP et 200 μ l de tampon.
- Incubation 15'.
- Blocage de la réaction par 100 μ l TCA 55%.
- Centrifuger pendant 15' au minimum à 1000 g (sinon le ferment sédimente mal).
- Prise de 50 μ l et dosage du P minéral selon Bartlett.

Résultats

L'hydrolyse est partout de 100 %; donc il est impossible de calculer les v_0 .

Commentaire

L'enzyme n'est pas dénaturé fortement par la thermostatisation à 25°C. Mais il a pu se produire une légère altération du ferment passée inaperçue à la suite d'une trop longue incubation.

3.1.2.1.2. Seconde expérience

Pour déterminer l'influence de la préthermostatisation sur les vitesses initiales, nous relevons un ensemble de cinétiques dans les conditions suivantes :

a) Substrats :

5'-AMP |S| = 4,91 mM

5'-GMP |S| = 4,83 mM

5'-IMP |S| = 5,3 mM

b) Enzyme :

Idem; |E| = 3,3 u/ml

c) Préthermostatisation : 90' à 25°C.

Ces conditions étant réalisées, le schéma de principe est le même que ci-dessus.

Résultats

Substrat	thermostatisation		A μ mole/ unité/min
	90'	5'	
5'-AMP	-	+	0,23
	+	-	0,23
5'-GMP	-	+	0,17
	+	-	0,16
5'-IMP	-	+	0,12
	+	-	0,12

3.1.2.2. Hydrolyse du 5'-AMP avec |E| variable

Appliquant la méthode de concentration variable d'enzyme qui a permis d'hydrolyser quelques substrats relativement résistants à l'action de la PDE, nous examinons ici la possibilité d'augmenter le v_0 de la 5'-nucléotidase par variation de |E|.

Schéma expérimental

On relève quatre cinétiques avec |E| variant de 1,25 u/ml à 10,0 u/ml.

Substrat : 5'-AMP |S| = 3,12 mM, toujours dans Tris-HCl 0,1 M, pH = 8,3, 8 mM en Mg^{2+} .

Résultats : L'extrapolation des vitesses initiales permet de calculer les paramètres suivants :

E u/ml	100% hydrolyse en	A umole/unité
1,25	6'	0,42
3,76	3'	0,28
6,25	2'	0,25
10,0	2'	0,16

Les vitesses sont telles qu'il est difficile de mesurer la fraction hydrolysée. Les cinétiques elles-mêmes sont peu commodes à relever. Cependant, il est à noter qu'on peut accélérer la vitesse de la réaction pratiquement à volonté.

3.1.2.3. Activité en fonction du pH

Il est fort utile de connaître le comportement de l'enzyme en fonction du pH. C'est dans ce but que nous avons relevé une courbe de pH optimum. Pour chaque pH de travail et pour chaque substrat, nous avons préparé une éprouvette dans laquelle le produit était dissous avec le tampon adéquat.

Au cours de la digestion enzymatique, les concentrations en substrats sont les suivantes :

5'-AMP	S = 5 mM
5'-GMP	S = 5 mM
5'-IMP	S = 5 mM
5'-UMP	S = 5 mM

D'un autre côté, on a préparé une éprouvette d'enzyme pour chaque pH en respectant une concentration à la digestion de |E| = 3,3 u/ml.

Gamme de pH :

Dans chaque éprouvette de substrat et d'enzyme, on ajoute aux fins de dissolution, une quantité de tampon qui assure le pH choisi et la concentration adéquate. Comme à l'accoutumée, le tampon est composé de Tris 0,1 N, pH réglé par HCl concentré, 4 mM en Mg^{2+} . Le choix des pH est établi comme suit :

pH ± 0,72	7,5	7,86	8,30	8,70	9,00	9,38	9,85	10,3
-----------	-----	------	------	------	------	------	------	------

Mode d'incubation :

Dans une éprouvette on introduit :

- 400 μ l de substrat
- 200 μ l de 5'-nucléotidase (Sigma no. 8877)
qu'on laisse incuber respectivement 2' pour 5'-AMP et 5'-GMP
4' pour 5'-IMP et 5'-UMP
- 300 μ l de TCA 55% pour blocage de la réaction
- 200 μ l de protéines inactives

1100 μ l centrifugés à 1000g pendant 15'.

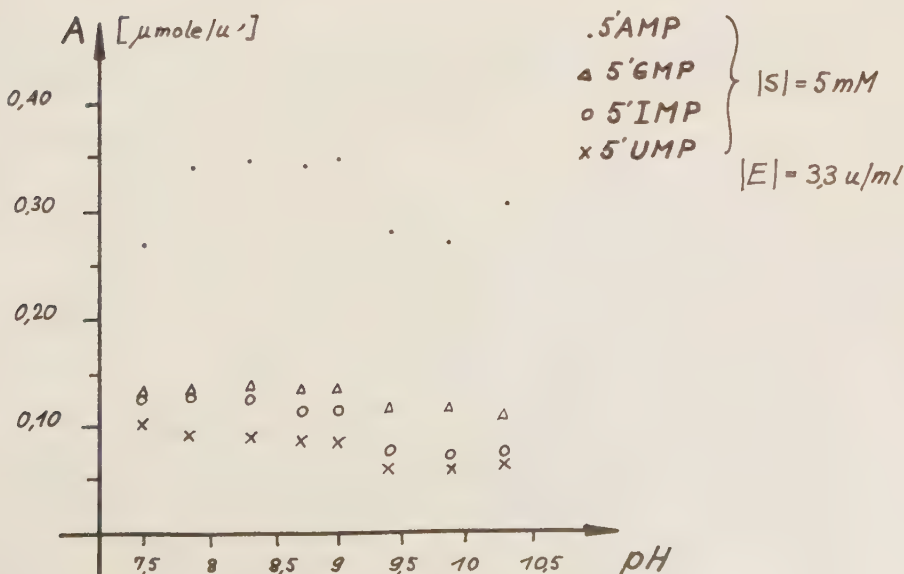
On prélève finalement 4 x 200 μ l de surnageant pour dosage du phosphore minéral selon la méthode de Bartlett.

La 5'-nucléotidase précipitée ayant un mauvais coefficient de sédimentation, nous avons ajouté des protéines inactives (BSA) avant la centrifugation. De cette manière, la concentration de protéines précipitées étant beaucoup plus grande, la formation du culot s'avère singulièrement plus aisée. On élimine en grande partie le risque de prélever, avec l'aliquote, une protéine qui gênerait considérablement le dosage du phosphore.

Les résultats, exprimés en activité A de l'enzyme sont communiqués dans le graphique ci-dessous.

$A = f(\text{pH})$ 5'-nucléotidase

$\theta = 25^\circ\text{C}$



Il est intéressant de constater que la 5'-nucléotidase manifeste son activité dans une très large gamme de pH pour les quatre substrats. On remarquera aussi que, le 5'-AMP étant le substrat d'élection du ferment, les trois autres substrats soit le 5'-GMP, le 5'-IMP et le 5'-UMP sont hydrolysés dans des rapports très voisins.

La 5'-nucléotidase de Sigma possède toutes les qualités requises. Le domaine de pH utilisable est large, la spécificité n'est pas trop étroite et par augmentation de $[E]$ nous pouvons exalter la vitesse d'hydrolyse des produits résistants.

3.2. Les cinétiques d'hydrolyse

3.2.1. Conditions expérimentales

Le thème de ces mesures a été emprunté aux cinétiques des nucléotides cycliques. Il faut toutefois quelques variations originales. Chaque fois l'enzyme sera utilisé à une concentration d'incubation de

$$[E] = 5 \text{ u/ml, quelle que soit la substance attaquée.}$$

La concentration des substrats est ajustée à

$$[S] = 3\text{mM (la pureté ayant été expérimentalement reconnue par les tests habituels).}$$

Les produits de réaction sont décelés par chromatographie; les incubations ont lieu à 25°C. Le pH a été très légèrement modifié à pH = 8,5, dans le tampon habituel, 8 mM en Mg^{2+} , 5 mM en mercaptoéthanol.

Nous avons fidèlement respecté le rapport des volumes établi pour les mesures calorimétriques soit :

500 μl de 5'-nucléotidase 7,5 u/ml

250 μl de substrat 9 mM

750 μl de milieu d'incubation $[E] = 5 \text{ u/ml}$

$$[S] = 3 \text{ mM.}$$

3.2.2. Résultats et commentaires

Les valeurs obtenues sont résumées dans le tableau suivant.

Sur la base des premiers chiffres de la cinétique, nous avons calculé la vitesse initiale v_0 en μmoles de substrat hydrolysés par ml et par minute. Les vitesses relatives sont le rapport des v_0 , le 5'-AMP, substrat de référence,

étant arbitrairement fixé à 100.

Substrat	v_o (μ mole/min)	v initiales relatives
5'-AMP	1,0	100
5'-GMP	0,45	45
5'-IMP	0,37	37
2'-d-5'-AMP	0,23	23
6-Cl-Pur-rib-5'-P	0,50	50
N ¹ -ox-5'-AMP	0,67	67
5'-XMP	0,025	2,5
8-Br-5'-AMP	0	0
N-6-Me-5'-AMP	0,40	40
N-6-n-bu-5'-AMP	0,32	32
N-6-diMe-5'-AMP	0,07	6,7
N-6-6-bu-5'-AMP	0,16	15,8
5'-UMP	0,47	47
5'-TMP	0,32	31,6
8-OH-5'-AMP	0,11	10,7
8-SH-5'-AMP	0	0
2'-O-butyryl-5'-IMP	0	0
2'-d-5'-IMP	0,05	4,7
2'-d-5'-GMP	0,15	14,5
Ethéno-5'-AMP	0,28	27,6
8-SH-5'-GMP	0	0

Commentaires

Dans nos conditions, quatre substrats sont insensibles à l'action de la 5'-nucléotidase; ce sont le 8-SH-5'-AMP, le 8-SH-5'-GMP, le 8-Br-5'-AMP et le 2'-O-butyryl-5'-IMP. Ces derniers nous avaient déjà causé des ennuis au cours de l'hydrolyse des phosphodiester; nous avons de grandes difficultés à suivre l'action de la PDE à cause de l'inactivité de la 5'-nucléotidase qui ne libère pas le phosphore inorganique des composés.

Nous constatons que le 5'-XMP manifeste une forte résistance à l'action du ferment. Ceci explique pourquoi, dans le calorimètre, le signal résultant a été beaucoup plus intense que prévu. Nous en étions alors à nos premiers

essais et les techniques de contrôle laissaient encore à désirer.

Par la suite, nous allons opérer un choix des substrats selon leur disponibilité et la vitesse à laquelle ils s'hydrolysent.

3.3. Les substrats

3.3.1. Synthèses

Plusieurs substrats proviennent de nos laboratoires. Le N¹-ox-5'-AMP a été obtenu par la même méthode qui a prévalu pour l'analogue cyclique. Les composés substitués en N-6 sont obtenus à partir du dérivé chloré en position 6 du noyau purique. Posternak (104) substitue l'atome de chlore par l'amine voulue avant la phosphorylation tandis que Robins (32) réalise la même opération après celle-là.

Nous devons à l'extrême obligeance de nos collègues d'avoir obtenu quelques mg de 8-SH-5'-AMP et de 8-SH-5'-GMP.

3.3.2. Les substrats testés au calorimètre

Nous opérons exactement suivant les prescriptions du paragraphe 2.4.

3.3.2.1. Dérivés puriques

a) 5'-AMP Fluka puriss	PM = 365	a) $\underline{98,6}$ - 100,2
Pureté indiquée 97%		b) $\bar{x}$ = 99,5%
		c) s^2 = 0,4
b) N ¹ -oxyde-5'-AMP	PM = 381	a) $\underline{97,0}$ - 101,9
Synthèse personnelle		b) $\bar{x}$ = 99,7 %
		c) s^2 = 2,7
c) 6-Cl-Pur-rib-5'-P	PM = 401	a) $\underline{82,6}$ - 84,5
P-L Laboratories		b) $\bar{x}$ = 83,4 %
		c) s^2 = 0,8
d) N-6-Méthyl-5'-AMP	PM = 361	a) $\underline{86,4}$ - 89,2
Laboratoire		b) $\bar{x}$ = 88,15
		c) s^2 = 1,5
e) 5'-GMP	PM = 363	a) $\underline{90,0}$ - 93,3
Fluka purum		b) $\bar{x}$ = 91,7
		c) s^2 = 2,1
f) 5'-IMP	PM = 392	a) $\underline{68,0}$ - 68,8
BDH		b) $\bar{x}$ = 68,3
		c) s^2 = 0,1

3.3.2.2. Dérivé pyrimidique

g) 5'-UMP	PM = 324	a) $\underline{86,8}$ - 91,8
Sigma		b) $\bar{x}$ = 88,6
		c) s^2 = 4,7

3.4. Etude calorimétrique

Pour tous renseignements d'ordre général cf. 2.5.1. et 2.5.2.

3.4.1. Mode expérimental

On prépare une solution d'enzyme et une solution de substrat aux concentrations voulues. Toute la séquence des opérations a lieu selon le mode décrit au paragraphe 2.5.3.1.2. Seule modification, répétons-le : pH = 8,5 (et non plus 8,3).

3.4.2. Résultats

ΔH [mcal] indique l'enthalpie mesurée

ΔH_g [kcal/mole] indique l'enthalpie de la réaction globale.

Substrats, [E], [S], Echelle	N°	ΔH [mcal]	ΔH_g [kcal/mole]	s ²
a) 5'-AMP [E] = 5 u/ml Ech.: 30 μ V [S] = 3 mM	1	18,2	1,01	
	2	18,1	1,01	
	3	17,9	0,99	
	4	17,8	0,99	
	5	17,7	0,98	
			$\overline{\Delta H_g} = 0,99$	<0,01
b) N ¹ -ox-5'-AMP [E] = 5 u/ml Ech.: 30 μ V [S] = 3 mM	1	19,05	1,02	
	2	19,4	1,03	
	3	18,9	1,05	
	4	19,2	1,07	
	5	19,35	1,08	
			$\overline{\Delta H_g} = 1,07$	<0,01

c) 6-Cl-Pur-ribo-5'-P $ E = 4 \text{ u/ml}$ Ech.: $30 \mu\text{V}$ $ S = 2,78 \text{ mM}$	1	16,7	1,00	
	2	16,9	1,01	
	3	17,1	1,02	
	4	17,0	1,02	
	5	17,0	1,02	
			$\overline{\Delta H_g} = 1,01$	$<< 0,01$
d) N-6-Me-S'-AMP $ E = 5 \text{ u/ml}$ Ech.: $30 \mu\text{V}$ $ S = 2,88 \text{ mM}$	1	17,6	1,02	
	2	17,55	1,01	
	3	17,45	1,00	
	4	17,65	1,02	
	5	17,4	1,00	
			$\overline{\Delta H_g} = 1,01$	$<< 0,01$
e) S'-GMP $ E = 6,5 \text{ u/ml}$ Ech.: $30 \mu\text{V}$ puis $10 \mu\text{V}$ $ S = 3 \text{ mM}$	1	6,11	0,34	
	2	5,75	0,32	
	3	5,72	0,32	
	4	5,60	0,31	
	5	5,43	0,30	
			$\overline{\Delta H_g} = 0,32$	$< 0,01$
f) S'-IMP $ E = 8,0 \text{ u/ml}$ Ech.: $10 \mu\text{V}$ $ S = 2,05 \text{ mM}$	1	3,22	0,26	
	2	3,47	0,28	
	3	3,36	0,27	
	4	3,55	0,29	
	5	3,54	0,29	
			$\overline{\Delta H_g} = 0,28$	$< 0,01$

g) 5'-UMP $ E = 8,0 \text{ V/ml}$ Ech.: 30 μV $ S = 3 \text{ mM}$	1	14,6	0,80	
	2	15,4	0,84	
	3	14,5	0,80	
	4	14,8	0,82	
	5	14,9	0,83	
			$\overline{\Delta H_g} = 0,82$	$< 0,01$

Remarquons en premier lieu que le $\overline{\Delta H_g}$ mesuré est faible par rapport à ce qu'on pouvait en attendre. Et surtout les valeurs sont endothermiques. Toute interprétation est actuellement illusoire, les chaleurs de protonation n'étant, pour le moment, pas encore déterminées.

Quoique ces mesures paraissent des plus précises, nous verrons que ces beaux résultats sont malheureusement accompagnés de nombreux épiphénomènes dont la mesure est très difficile.

3.4.3. Analyse de variance simple

Ici également, les résultats sont groupés dans une étendue relativement faible. Bien que l'analyse statistique des $\overline{\Delta H_g}$ cycliques nous ait donné une quasi-certitude sur la signification et l'indépendance des traitements, nous jugerons utile de la répéter ici. Ainsi nous comprenons mieux une réalité mathématique encore cachée.

Les résultats sont les suivants :

$$m = 7$$

$$N = 35$$

$$T = 27,524$$

$$\bar{x} = \mu = 0,7864$$

$$S_{II}^2 = 5,8580 \cdot 10^{-1}$$

$$S_I^2 = 1,23014 \cdot 10^{-4}$$

I

$$F = \frac{S_{II}^2}{S_I^2} = 4,722 \cdot 10^3 = 4722$$

$$F_{\text{table } 0,001} (6;28) = 5,240$$

$$F_{\text{table}} \ll F_{\text{calculé}}$$

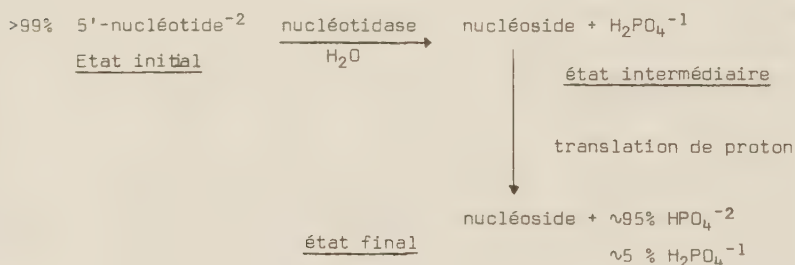
Les résultats sont indubitablement indépendants.

3.5. Phénomènes parasites

Il est évident que nous retrouvons ici les mêmes problèmes que nous avons tenté de résoudre au chapitre précédent. En deux paragraphes, nous allons parler premièrement des chaleurs de protonation, puis, secondement, des chaleurs de mélange.

3.5.1. Chaleurs de protonation

Une dernière fois nous allons réécrire l'équation chimique en portant une attention spéciale sur les échanges protoniques dont elle est la cause.



A l'état initial

Pas de problème d'échange protonique; à pH = 8,5, nous avons une dissociation du 5'-nucléotide à ~99,5% donc quasi-quantitative.

A l'état final

Le nucléoside, premier produit de réaction, existe sous forme non dissociée. Toutefois, entre l'état intermédiaire où le second produit de réaction se trouve sous forme $\text{H}_2\text{PO}_4^{-1}$ et l'état final où il existe sous les deux formes HPO_4^{-2} et $\text{H}_2\text{PO}_4^{-1}$, il se passe une translation de proton. Dans celle-ci, un proton part de la solution pour aller se fixer sur le HPO_4^{-2} . Le rapport $\text{HPO}_4^{-2}/\text{H}_2\text{PO}_4^{-1} \approx 0,05$ dépend du pK_2 de l'acide orthophosphorique.

On peut décomposer l'enthalpie mesurée ΔH_g en une somme d'enthalpies partielles où :

$\Delta H_{\text{hydrolyse}}$ = enthalpie de l'hydrolyse

ΔH_1 = départ d'un proton du milieu

ΔH_2 = fixation de ce proton sur HPO_4^{-2} qui devient HPO_4^{-1}

ΔH_3 = enthalpie de mélange

$\Delta H_1 + \Delta H_2 = \Delta H_{\text{protonation}}$

3.5.1.1. Calcul des enthalpies de protonation

Il est absolument acquis qu'au pH = 8,5, la seconde fonction acide du H_3PO_4 n'est pas quantitativement dissociée. Ordinairement, les tables spécialisées donnent à ce pK_2 la valeur de 7,2, à $\mu = 0$ comme il se doit. Or une mesure personnelle indique une valeur différente : pK_2 mesuré = 6,84 pour $\mu = 0,1$. Une fois de plus, il faut se référer à la littérature spécialisée. Nous ferons d'une pierre deux coups en examinant également les valeurs que les publications donnent pour l'enthalpie de la seconde ionisation du H_3PO_4 .

Pitzner, en 1937, opérant déjà avec un calorimètre de son invention, donne du ΔH° de la seconde ionisation la valeur suivante (96) :

$\Delta H^\circ = 800 \pm 80 \text{ cal/mole}$ à 25°C , en solution aqueuse.

De son côté, Grzybowski (97) fournit le renseignement suivant (potentiométrie) :

$\text{pK}_2 = 7,20$ $\Delta H^\circ = 1000 \pm 20 \text{ cal/mole}$ à 25°C , en solution aqueuse, $\mu = 0$

Au gré des méthodes, on trouve $\text{pK}_2 = 7,21$ par Bjerrum (98) tandis que Bates et Acree (99) indiquent (toujours à 25°C et $\mu = 0$)

$\text{pK}_2 = 7,20$ mais $\Delta H^\circ = 979 \text{ cal/mole}$

et Nims (100)

$\text{pK}_2 = 7,21$ $\Delta H^\circ = 824 \text{ cal/mole}$.

Rutman, dans une publication dont nous nous sommes déjà entretenus (84) donne :

$\text{pK}_2 = 7,18 \pm 0,02$ et $\Delta H^\circ = 760 \pm 400 \text{ cal/mole}$.

Pour Alberty (85),

$\text{pK}_2 = 6,64$ à $\mu = 0,15$ et 25°C .

Remarquons que toutes ces références concordent relativement bien sur le pK_2 . Quant au ΔH° , il n'en est pas de même. Cette dispersion doit nous rendre par-

ticulièrement modestes quant à une éventuelle imprécision de nos propres mesures.

Si nous prenons des valeurs moyennes pour l'enthalpie et comme pK_2 la grandeur indiquée par Alberty (à $\mu = 0,15$), nous avons :

$$pK_2 = 6,64 \text{ et } \Delta H^0 \approx 0,9 \text{ kcal/mole.}$$

Au pH de travail, ($= 8,5$), la dissociation du $H_2PO_4^{-1}$ est de :

$$8,5 = pH = pK_a + 1,86 \rightarrow \frac{|HPO_4^{-2}|}{|H_2PO_4^{-1}|} = 72,5 \text{ soit } 98,64 \% / 1,36 \%$$

Au départ, le 5'-nucléotide est dissocié à 99,6%. La différence affecte donc 1% de protons qui vont se fixer sur HPO_4^{-2} . L'enthalpie correspondante (si l'on considère que le proton migrateur est arraché au Tris) vaut :

$$\Delta H_{\text{arrachement du Tris}} = 0,01 \cdot 11,35 \text{ |kcal/mole|} = 0,11 \text{ kcal}$$

$$\Delta H_{\text{fixation sur } HPO_4^{-2}} = 0,01 \cdot (-0,9) \text{ |kcal/mole|} = -0,01 \text{ kcal}$$

$$\Delta H_{\text{migration du proton}} = 0,10 \text{ |kcal/mole| de produit hydrolysé par la 5'-nucléotidase.}$$

Un calcul identique avec notre pK_2 mesuré (6,84) donne les résultats suivants :

$$\frac{|HPO_4^{-2}|}{|H_2PO_4^{-1}|} = 45,7 \text{ soit } 97,86 \% / 2,14 \%$$

$$\text{donc une migration de } 1,6 \% \rightarrow H_{\text{migration}} = 0,16 \text{ kcal/mole.}$$

Si l'on tient compte de $pK_2 \approx 7,20$, alors :

$$\Delta H_{\text{migration}} = 0,45 \text{ kcal/mole.}$$

Celui qui veut calculer la chaleur de protonation selon les méthodes que nous avons jugées au chapitre précédent peut faire son choix. De notre côté, nous avons tenté de déterminer cette valeur en usant d'un processus original.

3.5.1.2. Détermination microcalorimétrique du $\Delta H_{\text{protonation}}$

Considérons une expérience microcalorimétrique réglée comme suit :

	Cellule 1	Cellule 2
Compartment 1	4 ml Enzyme habituel dans tampon pH 8,5, 0,15 M	Idem
Compartment 2	2 ml K_2HPO_4 7,5 mM dissous dans H_2O	2 ml KCl 15 mM dissous dans H_2O

Etat initial : Le K_2HPO_4 est un sel; la dissociation dans l'eau est complète
en $2 K^+ + HPO_4^{-2}$

Etat final : $HPO_4^{-2} \rightarrow H_2PO_4^{-1}$ selon le véritable pK_2

$$\Delta H_m = \Delta H_{\text{protonation}} + \Delta H_{\text{dilution du } K_2HPO_4}$$

Une expérience permettant de déterminer le $\Delta H_{\text{dilution}}$ du K_2HPO_4 a lieu dans les conditions suivantes :

	Cellule 1	Cellule 2
Compartment 1	4 ml Enzyme habituel dans tampon 0,1 M	Idem
Compartment 2	2 ml K_2HPO_4 7,5 mM dissous dans tampon 0,1 M	2 ml KCl 15 mM dans tampon ci-dessus

Les résultats expérimentaux sont les suivants :

ΔH_p		ΔH_{dil}		$\Delta H_{prot} = \Delta H_m - \Delta H_{dil}$
mcal	kcal/mole	mcal	kcal/mole	
79,0	0,526	+ 0,74	0,049	
92,8	0,618	+ 0,72	0,048	
85,0	0,567	+ 0,79	0,053	
82,0	0,546	+ 0,75	0,050	
88,8	0,592	+ 0,79	0,053	
85,1	0,567			
$\overline{\Delta H_m} = 0,57$		$\overline{\Delta H_{dil}} = 0,05$		$\overline{\Delta H_p} = 0,57 - 0,05 = 0,52$

Cette valeur $\overline{\Delta H_p}$ représente la chaleur de protonation que nous retrancherons de $\overline{\Delta H_g}$.

3.5.2. Les chaleurs de dilution

Elles ont toutes été mesurées à pH = 8,5. Beaucoup d'entre elles sont inférieures à 0,05 kcal/mole. Nous considérons cette valeur comme limite mesurable. Il n'est donc pas possible d'obtenir avec précision des chiffres inférieurs à cette valeur. La répartition des liquides dans le microcalorimètre est la même qu'au cours des expériences d'hydrolyse à ceci près qu'on n'a pas introduit d'enzyme.

Les valeurs relevées sont les suivantes :

Substrat	ΔH_3 [mcal]	ΔH_3 [kcal/mole]
5'-AMP endothermique 30 μ V	cf. 2.6.3.2.	$\overline{\Delta H} = 0,12$
1 N-ox-5'-AMP endothermique 30 μ V	0,747 0,777 0,711 0,642 0,660	0,050 0,052 0,047 0,043 0,044
		$\overline{\Delta H} = 0,05$

6-Cl-Pur-rib-5'-P endothermique 30 μ V	3,91	0,261
	4,12	0,274
	4,34	0,289
	3,36	0,224
	3,49	0,231
		$\overline{\Delta H} = 0,26$
N-6-Me-5'-AMP endothermique 30 μ V	3,74	0,249
	5,46	0,365
	4,77	0,318
	4,49	0,299
		$\overline{\Delta H} = 0,31$
5'-GMP endothermique 30 μ V	idem à 2,6,3,2,	$\overline{\Delta H} \approx 0,02$
5'-IMP endothermique 30 μ V	idem à 2.6.3.2.	$\overline{\Delta H} \approx 0,03$
5'-UMP endothermique 30 μ V	idem à 2.6.3.2.	$\overline{\Delta H} \approx 0,10$

3.6. Résultats définitifs

Enthalpies d'hydrolyse des 5'-nucléotides

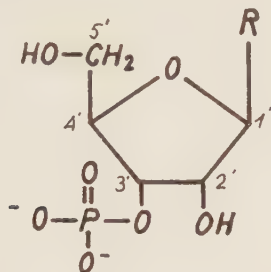
Substrat	ΔH global kcal/mole	ΔH prot kcal/mole	ΔH dil kcal/mole	ΔH hydr. kcal/mole
5'-AMP	0,99	0,52	0,12	+ 0,35
N ¹ -ox-5'-AMP	1,07	0,52	0,05	+ 0,50
6-Cl-Pur-rib-5'-P	1,01	0,52	0,26	+ 0,23
N-6-Me-5'-AMP	1,01	0,52	0,31	+ 0,18
5'-GMP	0,32	0,52	0,02	- 0,22
5'-IMP	0,28	0,52	0,03	- 0,27
5'-UMP	0,82	0,52	0,10	+ 0,20

Commentaire

D'une manière générale, l'enthalpie d'hydrolyse des liaisons monoester phosphorique des 5'-nucléotides est très basse. Sa détermination se révèle difficile par l'importance des corrections qui sont toujours délicates à estimer. Dans le plus favorable des cas, nous pouvons estimer la précision des résultats à $\pm 0,10$ kcal/mole.

4. LES 3'-NUCLEOTIDES

Après avoir examiné les liaisons phosphodiester et 5'-monoester, il est intéressant de considérer la liaison 3'-monoester. Ainsi, nous aurons étudié la véritable liaison hydrolysée par la PDE puisque cette dernière attaque le nucléotide cyclique du côté 3'.



4.1. 3'-Nucléotidase

On la trouve dans le commerce (Sigma, à des prix exorbitants) sous forme d'une poudre noire, séchée, extraite du Rye grass. Une bonne méthode de préparation a été décrite par Shuster (101). Le pH optimum est de 7,5 avec une baisse de l'activité de 50% à 9,0.

4.1.2. Les cinétiques d'hydrolyse

Par une série de cinétiques nous avons déterminé l'activité relative de l'enzyme en fonction de divers substrats. Malheureusement, l'étude est fortement limitée par le nombre de ceux-ci. Ils sont les suivants :

3'-AMP	Sigma
3'-GMP	Sigma
3'-IMP	Sigma

Le 8-bromo-3'-AMP provient de nos laboratoires de même que le 8-thio-3'-AMP. Les procédés expérimentaux sont identiques à ceux vus à propos de la 5'nucléotidase.

$$[S] = 3 \text{ mM}$$

$$[E] = 3,33 \text{ u/ml (1 unité hydrolysant 1 } \mu\text{mole de 3'-AMP à pH = 7,5 et } 37^\circ\text{C)}$$

$$\theta = 25^\circ\text{C}$$

L'enzyme et le substrat sont dissous dans du tampon Tris-HCl pH = 8,5, 8 mM en Mg^{2+} sans mercaptoéthanol qui est reconnu comme inhibiteur du ferment. La réac-

tion est bloquée par adjonction de TCA 55% et le degré de l'hydrolyse mesuré par dosage du P selon Bartlett.

Les quelques difficultés expérimentales particulières ont été résolues comme suit :

- a) La 3'-nucléotidase commerciale ne se dissout pas entièrement dans le tampon. Après 30' d'agitation, on centrifuge la solution afin d'éliminer un résidu noir qui représente une impureté. Les opérations sont faites avec le surnageant.
- b) Après l'addition du TCA, la solution vire au rose ce qui donne un blanc relativement fort (13 au Klett, filtre 66).

- c) Le 3'-GMP doit être agité longuement vu la lenteur de sa solubilisation.

Les résultats sont consignés dans le tableau ci-dessous et sur le graphique suivant.

Les vitesses relatives sont calculées par rapport au v_0 du 3'-AMP arbitrairement fixé à 100.

Substrat	Hydrolyse 100 % (fondée sur v_0)	v relative
3'-AMP	14,2'	100
3'-GMP	5,5'	258
3'-IMP	21,5'	66
8-Br-3'-AMP	48 '	30
8-SH-3'-AMP	80 '	18

Commentaires

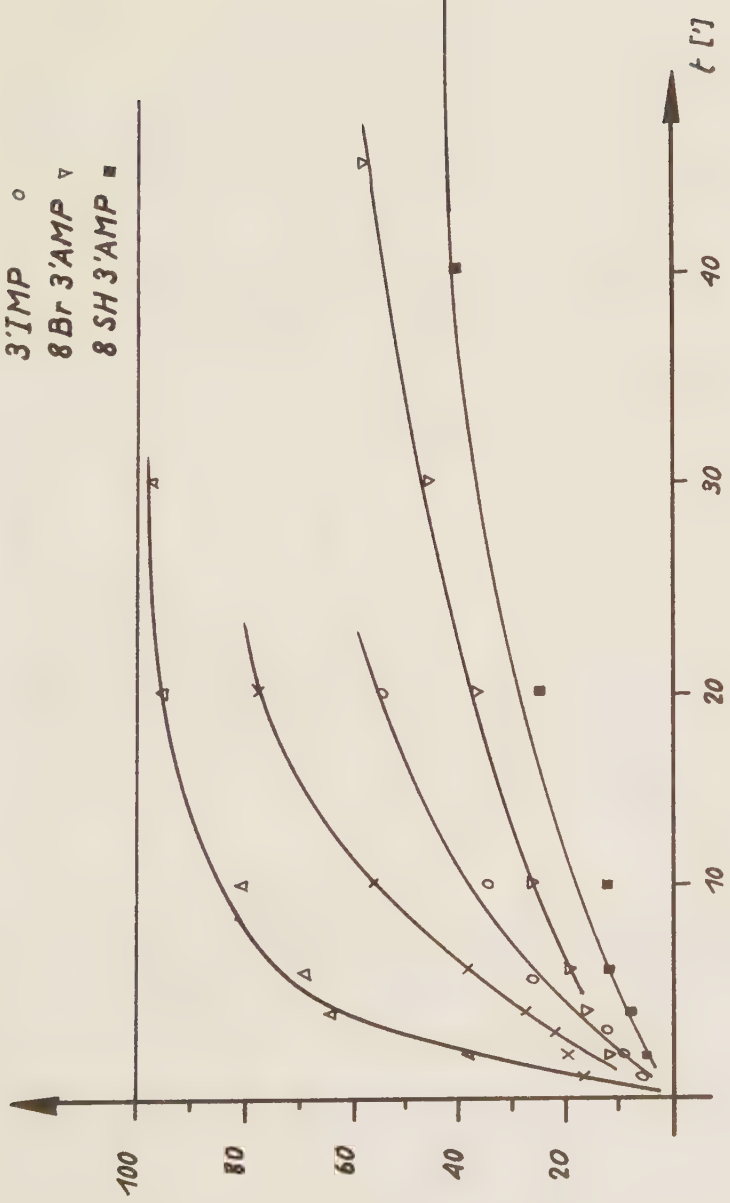
Nous avons la surprise de constater que le 3'-GMP est nettement mieux hydrolysé que le 3'-AMP alors que pour la 5-nucléotidase c'est l'inverse qui est vrai. D'autre part, le 8-bromo-3'-AMP et le 8-thio-3'-AMP ont une certaine sensibilité à l'action du ferment alors que les 5'-nucléotides analogues se montrent extrêmement résistants à l'égard de la 5'-nucléotidase.

4.1.3. Concentration de l'enzyme

Si l'enthalpie de la liaison 3' se montre aussi faible que chez son homologue 5', la lenteur de l'hydrolyse nous posera des problèmes au microcalorimètre. Afin de les éviter, nous voulons une fois encore concentrer le ferment.

Hydrolyse des 3'nucléotides :

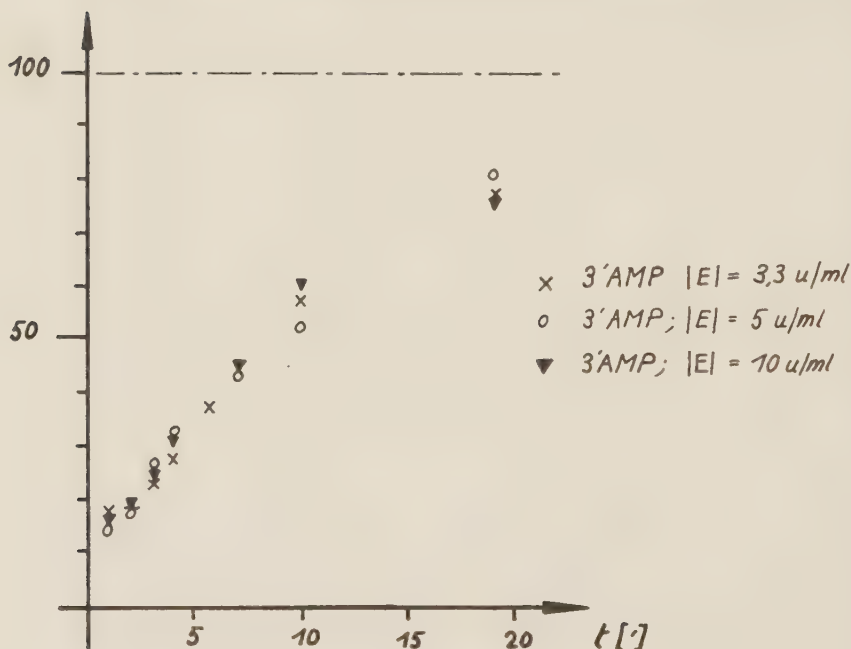
- 3'AMP x
- 3'GMP Δ
- 3'IMP o
- 8Br 3'AMP ▽
- 8SH 3'AMP ■



En conséquence, nous avons relevé trois cinétiques sur le 3'-AMP à $[S] = 3 \text{ mM}$, avec $[E]$ variable.

Le graphique montre que, malheureusement, il n'est guère possible de concentrer l'enzyme. Ce dernier atteint probablement sa solubilité maximum à 5 u/ml . La dissolution extrêmement laborieuse semble bien confirmer l'hypothèse ci-dessus (impuretés insolubles ?).

Hydrolyse 3'AMP avec $[E]$ variable



4.2. Les substrats testés au calorimètre

Les cinétiques montrent que seuls deux substrats peuvent raisonnablement espérer être hydrolysés au calorimètre; ce sont le 3'-AMP et le 3'GMP.

Leurs puretés sont les suivantes :

- | | | |
|--------------|-----------------------|----------------|
| a) 3'-AMP | Sigma | PM = 364 |
| a) 87,5-88,6 | b) $\bar{x} = 88,0\%$ | c) $s^2 = 0,3$ |
| b) 3'GMP | Sigma | PM = 394 |
| a) 73,0-78,2 | b) $\bar{x} = 75,4\%$ | c) $s^2 = 4,1$ |

Bien entendu la pureté des produits a été dûment contrôlée, comme d'habitude, par des méthodes chromatographiques.

4.3. Mesure des enthalpies de réaction

Les conditions expérimentales n'ont pas varié. Nous travaillons dans un tampon Tris-HCl 0,1 N, pH=8,5, 8 mM en Mg^{2+} , sans mercaptoéthanol, reconnu comme inhibiteur.

La répartition des liqueurs est la suivante :

	Cellule 1	Cellule 2
Compartment 1	4 ml 3'-nucléotidase 5 u/ml dans tampon pH = 8,5	Idem
Compartment 2	2 ml substrat 7,5 mM dissous dans le même tampon	Idem

En ce qui concerne le 3'-AMP, nous n'avons relevé aucun ennui majeur en cours d'expérience hormis le fait que la réaction est relativement lente compte tenu de son dégagement énergétique faible; l'expérience calorimétrique est difficile.

Les résultats sont les suivants :

Substrat, $[E]$ $[S]$, Echelle	n^0	ΔH [mcal]	ΔH_g , kcal/mole]	s^2
3'AMP (exothermique) $[E] = 3,33$ U/ml Ech: 30 μ V $[S] = 2,64$ mM	1	- 29,7	- 1,88	
	2	- 27,6	- 1,73	
	3	- 27,1	- 1,71	
	4	- 27,2	- 1,72	
	5	- 17,9	- 1,76	
			$\overline{\Delta H_g} = - 1,76$	< 0,01

3'-GMP	1	- 25,2	- 1,86	
(exothermique)	2	- 28,0	- 2,07	
E = 3,33 u/ml	3	- 29,1	- 2,14	
Ech: = 30 μ V	4	- 25,5	- 1,85	
S = 2,26 mM			$\overline{\Delta H_g} = - 1,98$	0,02

4.4. Corrections

4.4.1. Chaleurs de protonation

Le pK_2 mesuré des deux produits de départ a la valeur suivante :

3'-AMP pK_2 mesuré = 6,08

3'-GMP pK_2 mesuré = 6,04

La dissociation est donc quantitative à 99,6%. Nous effectuerons la même correction que pour les 5'-nucléotides soit $\Delta H_p = 0,52$ kcal/mole.

4.4.2. Chaleurs de dilution

Elles ont été déterminées par les expériences habituelles. Les résultats sont les suivants :

Substrat	ΔH_3 mcal	ΔH_3 kcal/mole
3'-AMP	2,85	0,180
30 μ V	3,06	0,193
endothermique	3,72	0,235
	3,82	0,242
	3,00	0,189
		$\overline{\Delta H_3} = 0,21$
3'-GMP	5,13	0,378
30 μ V	3,26	0,241
endothermique	4,71	0,348
	4,34	0,320
		$\overline{\Delta H_3} = 0,32$

4.5. Résultats définitifs

Substrat	ΔH global kcal/mole	ΔH prot kcal/mole	ΔH dil kcal/mole	ΔH hydr + 0,1 kcal/mole
3'-AMP	- 1,76	0,52	0,21	- 2,49
3'-GMP	- 1,98	0,52	0,32	- 2,82

Nous constatons que l'enthalpie d'hydrolyse de ces 3'-nucléotides est exothermique. Elle est beaucoup plus importante, en valeur absolue, que celle des 5'-nucléotides correspondants. Cette différence est peut-être attribuable aux "tensions non liantes" qui contraignent la rotation du groupe phosphoryle en 3', alors que la rotation en 5' est pratiquement libre. Ces contraintes sont dues à l'hydroxyle en C(2') et à l'hydrogène en C(4').

Ces résultats étant acquis, nous allons voir quelle philosophie ces chiffres nous inspirent et quelle raison directrice nous pouvons extraire de cette boulimie expérimentale.

5. DISCUSSION

5.1. Comparaison avec les résultats de Greengard

Il est incontestable que nos résultats diffèrent sensiblement de ceux obtenus par l'équipe de Greengard. Nous en donnons un bref aperçu dans le tableau suivant.

Substrat	ΔH d'hydrolyse de la liaison cyclique selon		
	Greengard $\left \text{kcal/mole} \right $ A	nos mesures $\left \text{kcal/mole} \right $ B	Différence A - B
cAMP	- 14,1	- 13,5	- 0,6
cGMP	- 10,5	- 8,0	- 2,5
cIMP	- 13,4	- 11,0	- 2,4
cUMP	- 12,0	- 8,3	- 3,7

Nous devons relever que nos conditions expérimentales sont très différentes de celles des Américains.

Mentionnons en premier lieu que le calcul des chaleurs de protonation procède d'une méthode radicalement différente dans les deux cas et que les pH de travail sont respectivement de 7,3 et 8,3.

Or, il est notoire que les chaleurs d'hydrolyse sont très fortement dépendantes du pH. De plus, le pH de travail de Greengard étant beaucoup plus proche du pK_2 des 5'-nucléotides que le nôtre, ses erreurs sur la constante de dissociation de la seconde fonction acide sont quasiment multipliées par 10. En conséquence, les variations de la chaleur de protonation deviennent vite importantes en raison de la très forte valeur du ΔH_{prot} du Tris ($\Delta H_{\text{prot Tris}} = - 11,35 \text{ kcal/mole}$).

Dans notre cas, le pH de travail = 8,3 nous assurant une dissociation environ égale à 99%, il appert que les erreurs de cette nature sont réduites à des valeurs beaucoup plus faibles.

Dès lors, on ne s'étonnera pas outre mesure des différences constatées ci-dessus.

5.2. Influence de la structure des substrats

5.2.1. Structure et vitesse d'hydrolyse

D'une manière générale, nous pouvons dire que la substitution opérée en position 8 du noyau purique affecte aussi bien l'hydrolyse des composés cycliques que non cycliques. Toutefois, on relèvera que le 8-thio-3'-AMP s'hydrolyse lentement, mais de manière sensible sous l'action de la 3'-nucléotidase, tandis que ses homologues 5' et 3',5' sont absolument résistants à la 5'-nucléotidase et à la PDE. Nous remarquons que l'encombrement stérique des groupements substituants en N⁶ est un facteur de ralentissement de l'activité enzymatique, aussi bien pour les composés cycliques que les 5'-nucléotides.

Notons encore que si, dans la classe des nucléotides cycliques, la PDE se montre aussi active pour le cAMP, le cGMP et le cIMP, il n'en est pas de même pour les 5'-nucléotides où le 5'-AMP est de loin le substrat d'élection de l'enzyme utilisé. Nous attribuons cette différence au fait que la PDE utilisée est un mélange contenant de nombreux isozymes ayant deux K_m différents tandis que la 5'-nucléotidase vendue dans le commerce est mieux purifiée et ne posséderait qu'un seul K_m .

Au sujet des substitués en N⁶, nous dirons que la PDE est inhibée uniquement par le volume du substituant; la 5'-nucléotidase par contre, utilise certainement un des deux hydrogènes de l'azote comme point d'attache du substrat. Nous en voulons pour preuve le fait que le N⁶-t-bu-5'-AMP dont le groupement quoique plus volumineux laisse un hydrogène de libre sur l'azote.

Enfin, il est remarquable que le cXMP est dix fois mieux hydrolysé par la PDE que le 5'-XMP par la 5'-nucléotidase.

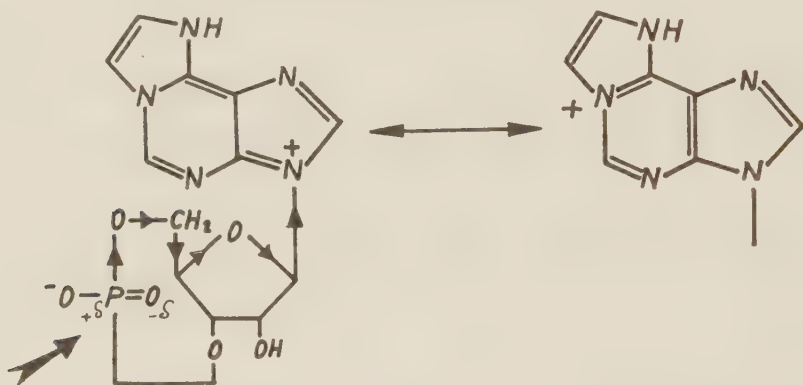
La 3'-nucléotidase, quant à elle, manifeste une activité 2,5 fois plus grande pour le 3'-GMP que pour le 3'-AMP.

5.2.2. Enthalpie et structure

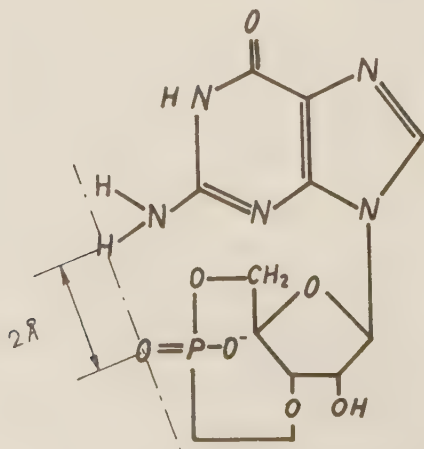
Il nous paraît extrêmement aléatoire de tirer des conclusions sérieuses et définitives quant à l'influence de la structure sur l'enthalpie d'hydrolyse au sein d'une même série de substrats. Quoiqu'il en soit, il était des plus intéressant de déterminer ces valeurs thermodynamiques sur un nombre aussi élevé que possible de substances.

Dans la série des nucléotides cycliques, nous constatons que deux substrats donnent une enthalpie d'hydrolyse sensiblement plus basse que le cAMP; ce sont le cGMP et l'éthéno-cAMP. On peut donner à ce phénomène les explications suivantes, en grande partie hypothétiques.

L'éthéno-cAMP représente un sel interne d'une base d'ammonium quaternaire. La charge positive sur le squelette purique peut induire un déplacement électronique le long du pont oxydique du ribose et, par relais, labiliser le cycle phosphodiester. La liaison ainsi déséquilibrée fournit une chaleur d'hydrolyse plus faible que celle obtenue dans d'autres cas.



La construction du cGMP par un modèle de Dreiding montre clairement que l'établissement d'une liaison hydrogène est possible entre le H fixé sur le N² et le O non ionisé appartenant au phosphore. Il est alors nécessaire que la demi-chaise du noyau furannique se transforme en une enveloppe dans laquelle le C⁴ est hors-plan. La distance mesurée est de 2 Å ce qui est à peu près idéal pour une liaison de ce genre. Ainsi, la délocalisation entraînée par la double liaison P=O se trouve renforcée, et l'attaque nucléophile sur le phosphore est facilitée d'autant. Dans ce cas-ci également, cette labilité relative, acquise par la liaison diester, entraîne un abaissement de l'enthalpie dégagée au cours de l'hydrolyse.



Le blocage du groupe amino en 2 du cGMP empêche probablement la formation de la liaison hydrogène qui labilise le cycle de phosphodiester. C'est pourquoi on enregistre pour le N²-monobutyryl-cGMP une enthalpie d'hydrolyse se trouvant entre les valeurs du cAMP et du cGMP.

En admettant que l'hydrolyse du cGMP détruit la liaison hydrogène, la chaleur de formation de celle-ci valant - 3 kcal/mole, on peut admettre que la rupture du cycle de phosphodiester seul vaut :

$$\Delta H = - 8,0 - (+3,0) = - 11,0 \text{ kcal/mole}$$

Cette valeur est pratiquement identique à celle obtenue pour le N²-monobutyryl-cGMP.

L'addition d'une petite chaîne aliphatique à la fonction amino en 2 du cGMP doit contrarier la formation de la liaison hydrogène qui labilise probablement le cycle diester. C'est pourquoi on enregistre pour le N²-monobutyryl-cGMP une enthalpie d'hydrolyse se trouvant entre les valeurs du cAMP et du cGMP.

Il est également surprenant de constater que les effets des substitutions en C⁸ ne sont pas les mêmes selon la base sur laquelle elles ont lieu. Tandis que le 8-Br-cAMP donne une chaleur d'hydrolyse inférieure de 4,0 kcal/mole à celle du cAMP, le contraire se produit pour le 8-Br-cJMP dont l'enthalpie d'hydrolyse dégage 2,0 kcal/mole de plus que le cJMP. Comme il est vraisemblable que le nucléotide substitué en C⁸ prend en solution la conformation syn, on voit mal quelle peut être l'influence du Br sur le cycle diester.

Dans le cas des bases pyrimidiques, on ne peut pas expliquer la faiblesse de l'enthalpie par des considérations d'influence stérique, puisque dans ces produits, le cycle à six atomes formé par la base est beaucoup trop éloigné du cycle diester pour créer la moindre influence sur celui-ci.

Pour les 5'-nucléotides, l'étendue des enthalpies en fonction des différents substrats vaut :

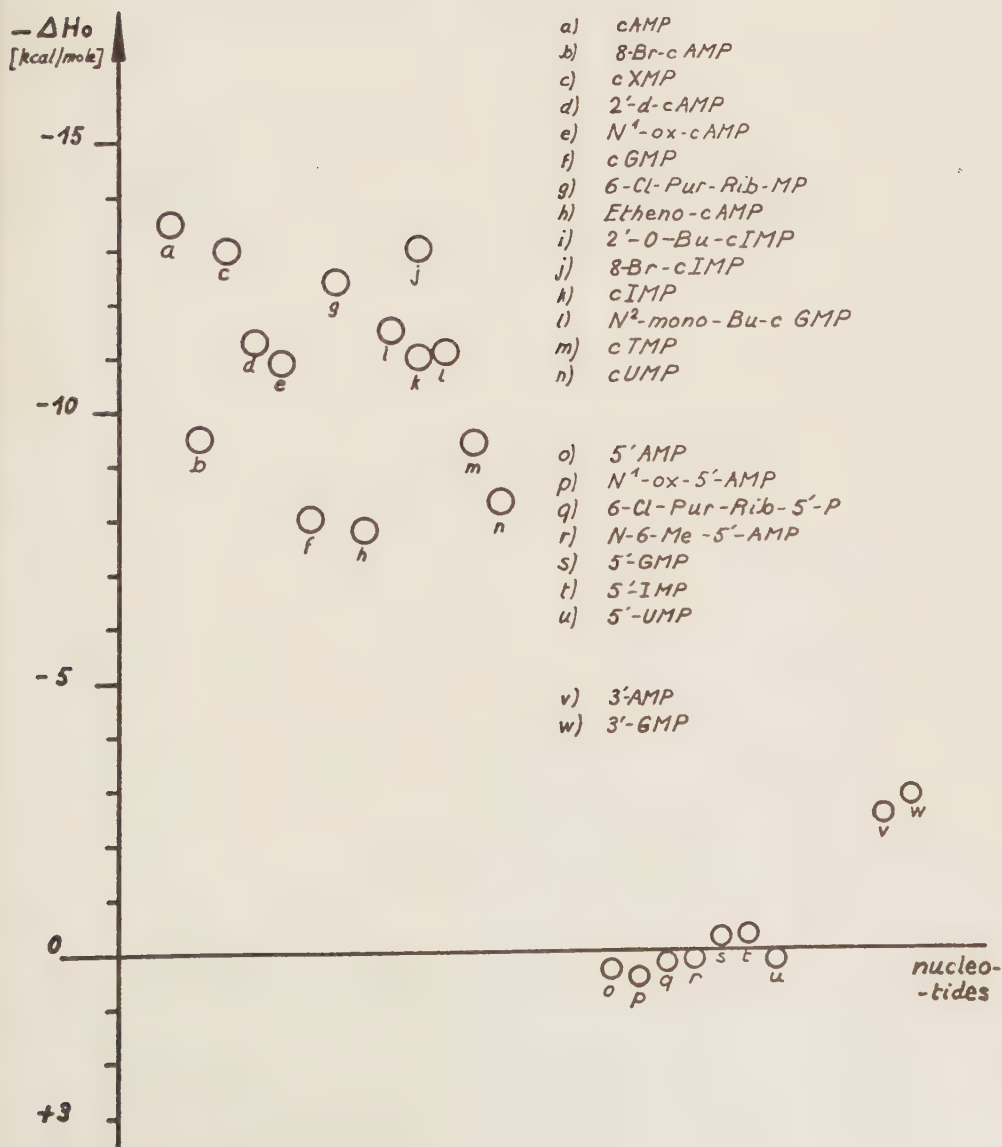
$$e \approx 0,8 \text{ kcal/mole}$$

et la médiane :

$$\text{Médiane} = 0,2 \text{ kcal/mole.}$$

Ces deux paramètres nous indiquent à quel point les résultats sont voisins les uns des autres et combien la grandeur mesurée se rapproche de zéro. Ainsi, on estime d'un seul coup que les variations de structure affectant le 5'-nucléotide ont peu d'effet sur les chaleurs d'hydrolyse. La rupture hydrolytique de la liai-

Enthalpie d'hydrolyse des $\begin{cases} 3'-5' \text{ nucléotides} \\ 5' \text{ nucléotides} \\ 3' \text{ nucléotides} \end{cases}$



son P-O(5') ne produit pas des échanges thermiques de grande importance.

Il n'en est pas de même dans la classe des 3'-nucléotides, où, malheureusement, nous n'avons étudié que deux substrats au calorimètre. Qu'importe, on constate tout uniment que le 3'-AMP et le 3'-GMP libèrent 2,5 à 2,8 kcal/mole au cours de leur hydrolyse, ce qui représente un échange calorifique déjà considérable.

Indubitablement, ces quelques réflexions concernant l'influence exercée par diverses substitutions des molécules sont d'un intérêt certain. La comparaison des chiffres obtenus en fonction des diverses classes de substrats est significative. Le graphique montre sans contestation que les différences entraînées par la position du groupe phosphoryle et ses liaisons avec le ribose sont beaucoup plus importantes que les modifications de la base.

5.2.3. Conclusions

Avant de tirer toute conclusion, il faut tenir compte des travaux récents dont nous n'avions pas connaissance lors de la rédaction de ce manuscrit.

Des auteurs japonais (106) ont réussi à cristalliser une adényl-cyclase extraite du "Brevibacterium liquefaciens". A l'aide de ce ferment hautement purifié, il se sont livrés à diverses études thermodynamiques.

De celles-ci, nous constatons entre autres qu'en appliquant la formule classique de Van t'Hoff :

$$\Delta G^{\circ} = - RT \ln K$$

les Japonais obtiennent une enthalpie d'hydrolyse par la phosphodiesterase

$$\Delta H^{\circ} = - 8,7 \text{ kcal/mole}$$

laquelle est bien plus faible que celle indiquée par Greengard et confirmée par nous-mêmes ($\Delta H^{\circ} \approx - 14 \text{ kcal/mole}$).

D'autre part, il faut remarquer, qu'à la base des calculs de Greengard figure le ΔG° d'hydrolyse de l'ATP suivant l'équation :



Pour cette énergie, Alberty a donné la valeur $\Delta G^{\circ} = - 10,3 \text{ kcal/mole}$. L'examen approfondi du travail d'Alberty indique toutefois que cet auteur a utilisé une constante de dissociation non corrigée, mesurée à une force ionique de 1 M alors que les calculs sont censés être appliqués à une force ionique de 0,2 M. Le chiffre d'Alberty est donc certainement erroné. D'autre part, il faut, en toute rigueur, tenir compte du fait que l'ATP et le pyrophosphate forment des complexes assez stables avec le magnésium alors que l'expérience montre qu'on

peut négliger les complexes que le magnésium forme avec le cAMP et les 5'-nucléotides.

Un calcul approfondi permettrait peut-être d'expliquer les différences apparues entre les chiffres de Greengard et ceux des auteurs japonais.

RESUME

Nous avons extrait du cerveau de rat un mélange de phosphodiesterases hydrolysant des nucléotides cycliques. L'activité de ce ferment a été mesurée sur 29 analogues du cAMP.

Par lyophilisation, il a été possible de concentrer le ferment et d'obtenir une solution stable d'enzyme d'une activité et d'une concentration réglables. Cette méthode de "concentration de l'enzyme" a permis d'augmenter la vitesse d'hydrolyse des substrats. De cette manière, il a été possible de déterminer l'enthalpie d'hydrolyse de 14 produits en mesurant la chaleur dégagée au cours de la réaction dans un microcalorimètre LKB 10700 Batch. La valeur obtenue représente une enthalpie de réaction globale. Au moyen du même appareillage nous avons, par une méthode originale, déterminé les chaleurs dues à l'échange protonique de la réaction et mesuré les chaleurs de mélange.

Une étude enzymatique et thermodynamique semblable a été effectuée sur des analogues du 5'-AMP. Nous avons examiné l'action d'une 5'-nucléotidase extraite de venin de serpent sur 21 substrats. Parmi ceux-ci, nous en avons trouvé 7 dont la vitesse d'hydrolyse était suffisante pour qu'il soit possible de déterminer leur enthalpie d'hydrolyse au microcalorimètre.

Enfin, sur un nombre réduit de 3'-nucléotides nous avons testé une 3'-nucléotidase commerciale extraite du "rye grass". L'enthalpie d'hydrolyse de 2 substrats, le 3'-AMP et le 3'-GMP a été déterminée au calorimètre.

D'une manière générale, l'AMP est un substrat d'élection des 3 enzymes testés sauf pour la 3'-nucléotidase où le 3'-GMP est plus rapidement hydrolysé que le 3'-AMP. Le GMP et le IMP se laissent facilement hydrolyser tandis que les substitués en C⁸ se montrent beaucoup plus résistants à l'action du ferment. Les substitutions en N⁶ et en 2'-O sont également un facteur de ralentissement de la réaction.

Les enthalpies obtenues montrent que l'hydrolyse des nucléotides cycliques est fortement exothermique ($7,8 \leq \Delta H \leq 13,5$ kcal/mole) tandis que les 5'-nucléotides ne donnent pas lieu à des échanges calorifiques importants ($-0,27 \leq \Delta H \leq 0,50$ kcal/mole); les 3'-nucléotides donnent une hydrolyse exothermique ($\Delta H \approx -2,8$ kcal/mole). Ces résultats s'expliquent si l'on considère que le cycle de phosphodiester des nucléotides cycliques est très tendu, tandis que la rotation du groupe phosphoryle est pratiquement libre dans les 5'-nucléotides et fortement entravée dans les 3'-nucléotides. Dans ce dernier cas, les tensions non liées expliqueraient l'importance de l'enthalpie constatée.

BIBLIOGRAPHIE

- 1) T.W.Rall, E.W. Sutherland, J. Berthet. J. Biol.Chem. 224, 463 (1957)
- 2) G.A. Robison, R.W. Butcher, E.W. Sutherland. Ann.Rev. Biochem. 37, 149 (1968)
- 3) E.W. Sutherland, T.W. Rall. J.Am. Chem. Soc. 79, 3608 (1957)
- 4) E.W. Sutherland, T.W. Rall, Pharmacol. Rev. 12, 265 (1960)
- 5) L.M. Klainer, Y.M.Chi, S.L. Friedberg, T.W. Rall, E.W. Sutherland, J. Biol. Chem. 237, 1239 (1962)
- 6) R.C. Haynes, jr, S.B. Koritz, F.G. Peron. J. Biol.Chem. 234, 1421 (1959)
- 7) J.M. Marsh, K. Savard. Steroids 8, 33 (1966)
- 8) J.S. Handler, R.W. Butcher, E.W. Sutherland, J. Orloff, J. Biol. Chem. 240, 4524 (1965)
- 9) R.R. Novalés, W.J. Dawis, Endocrinology 81, 283 (1967)
- 10) W.H. Cock, D. Lipkin, R. Markham. J.Am. Chem. Soc. 79, 3607 (1957)
- 11) D. Lipkin, W.H. Cook, R. Markham. J.Am.Chem.Soc. 81, 6198 (1959)
- 12) T.W. Rall, E.W. Sutherland, J. Biol.Chem. 232, 1065 (1958)
- 13) J.P. Jost, H.V. Rickenberg. Ann.Rev. Biochem. 40, 741 (1971)
- 14) K. Watenpugh, J.Dow, L.H. Jensen, S. Furberg, Science 159, 206 (1968)
- 15) C.L. Caulter. Acta Cryst. B 25, 2055 (1969)
- 16) M. Smith, C. Jardetzky, Drakakis. J.Mol. Spectrosc. 28, 70 (1968)
- 17) R.D. Lapper, H.H. Mantsch, I.C.P. Smith, J.Am.Chem.Soc. 94, 6243 (1972)
- 18) P.C. Zamecnik, Biochem. J. 85, 257 (1962)
- 19) R.A. Izatt, L.D. Hansen, J.H. Rytting, J.J.Christensen, J.Am. Chem.Soc. 87, 2780 (1965)
- 20) P.A. Levene, L.W.Bass, H.S. Simms. J.Biol.Chem. 70, 226 (1929)
- 21) P.A. Levene, H.S. Simms, L.W. Bass. J.Biol.Chem. 70, 243 (1929)
- 22) M.Smith, G.I. Drummond, H.G. Khorana.
- 23) J.G. Falbriard, T. Posternak, E.W. Sutherland. Biochim.Biophys. Acta 148, 99 (1967)
- 24) W.F. Henion, E.W. Sutherland, T. Posternak, Biochim.Biophys. Acta 148, 106 (1967)
- 25) G.Cehovic, I.Marcus, S.Vengadabady, T.Posternak. Compt.Rend. Soc.Phys. Hist.Nat. 3, 135 (1968)
- 26) G.Cehovic. Compt.Rend.Acad.Sci. (Paris) 268 D, 2929 (1969)
- 27) T.Posternak, I.Marcus, A.Gabbai, G.Cehovic. Compt.Rend. Acad.Sci. 269 D, 2409 (1969)
- 28) G.Cehovic, I. Marcus, A.Gabbai, T.Posternak, Compt.Rend.Aacad.Sci. 271 D, 1399 (1971)

- 29) T.Posternak, I.Marcus, G.Cehovic, Compt.Rend.Acad.Sci. 272 D, 622 (1971)
- 30) G.Cehovic, P. Mobley. Compt.Rend.Acad.Sci. 274 D, 3577 (1972)
- 31) K.Muneyama, R.J. Bauer, D.A. Shuman, R.K. Robins, L.N. Simon, Biochemistry 10, 2390 (1971)
- 32) R.B. Meyer, D.A. Shuman, R.K. Robins, R.J. Bauer, M.K. Dimmitt, L.N. Simon, Biochemistry 11, 2704 (1972)
- 33) J.P. Miller, K.H. Boswell, K.Muneyama, L.N. Simon, R.K. Robins, D.A.Shuman, Biochemistry 12, 5310 (1973)
- 34) R.J. Bauer, K.R. Swiatek. R.K. Robins, L.N. Simon, Biochem. Biophys.Res. Commun. 45, 526 (1971)
- 35) C.A. Free, M. Chasin, V.S. Park, S.M. Hess, Biochemistry 10, 3785 (1971)
- 36) W.C. Lake, A.K.M. Anisuzzaman, R.L. Whistler, Abstracts 164th ACS Meeting, 1972
- 37) O.Hayaishi, P. Greengard, S.P. Colowick, J.Biol.Chem. 246, 5840 (1972)
- 38) P. Greengard. Ann.N.Y. Acad.Sci. 175, 18 (1972)
- 39) R.A. Alberty, J.Biol.Chem. 244, 3290 (1969)
- 40) P. Greengard, O.Hayaishi, S.P. Colowick. Fed. Proc. 28, 467 (1969)
- 41) R.W. Butcher, E.W. Sutherland, J.Biol.Chem. 237, 1244 (1962)
- 42) K.G. Nair, Biochemistry 5, 150 (1966)
- 43) P. Greengard, S.A. Rudolph, J.M. Sturtevant. J.Biol. Chem. 244, 4798 (1969)
- 44) S.A. Rudolph, E.M. Johnson, P. Greengard. J.Biol.Chem. 246, 1271 (1971)
- 45) T.H. Benzinger, C.Kitzinger. Fed.Proc.Fed.Amer. Soc.Exp.Biol. 13, 11(1954)
- 47) M.Szabo, G. Burke, Biochim. Biophys.Acta 284, 208 (1972)
- 46) T.H.Benzinger. Fractions (Beckman Instrument) 1965, No. 2
- 48) U.Schwabe, S.Berndt, R.Ebert, Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 273, 62 (1972)
- 49) M.T. Campbell, I.T.Oliver.Eur.J.Biochem. 28, 30 (1972)
- 50) J.G. Hardmann, E.W. Sutherland. J.Biol.Chem.240, 3704 (1965)
- 51) S.Kakiuchi, R. Yamazaki, Y.Teshima, Biochem.Biophys. Res. Commun.42, 968 (1971)
- 52) P.P.Chao-Lin, J.E. Varner, Biochim. Biophys. Acta. 276,454 (1972)
- 53) T. Dousa, I.Rychlik. Biochim.Biophys.Acta 204, 10 (1970)
- 54) J.A.Gerlt, F.H.Westheimer, J.Amer.Chem.Soc. 95, 8166 (1973)
- 55) R.J.Hrapchak. H.Raasmussen.Biochemistry 11, 4458 (1972)
- 56) E.N. Goren, O.M. Rosen, Arch.Biochem.Biophys. 153, 384 (1972)
- 57) A. Lagarde, L. Colobert, Biochim.Biophys. Acta 276, 444 (1972)
- 58) W.Y. Cheung, Biochemistry 6, 1079 (1967)

- 59) P.Uzunov, B.Weiss, Biochim.Biophys. Acta 284, 220 (1972)
- 60) G.Cehovic, T. Posternak, E. Charollais. Adv.Cyclic Nucleotide Research 1, 521 (1972)
- 61) G. Broocker, L.I.Thomas, M.M. Appleman, Biochemistry 7, 4177 (1968)
- 62) O.H.Lowry, N.I.Rosenbrough, A.L.Farr, R.I.Randall. J. Biol. Chem. 193, 265 (1951)
- 63) G.R. Bartlett. J.Biol.Chem. 234, 466 (1959)
- 64) U.Klotz, K.Stock. Naunyn-Schmiedeberg's Arch.Pharmacol. 269, 117 (1971)
- 65) N.Miki,H.Yoshida. Biochim. Biophys.Acta 266, 166 (1972)
- 66) C.de Duve. J.Theoret, Biol. 6, 33 (1964)
- 67) C.de Duve. The Harvey Lectures 59, 49 (1965)
- 68) C.H. Fiske, Y.Subba Row. J.Biol.Chem. 66, 375 (1925)
- 69) D.Kirschenbaum. Int.J.Protein Research 4, 63 (1972)
- 70) Org. Synthesis 42, 77.
- 71) P.D. Mathias, Brit.Med. Bull. 22, 146 (1968)
- 72) W.J.Evans. Biochemical Microcalorimetry Acad. P.N.Y. (1969) 257
- 73) I.Wadsö. Acta Chem.Scand. 22, 927 (1968)
- 74) C. Bjurulf, O.Laynez, I.Wadsö. Eur. J.Biochem. 14, 47 (1970)
- 75) P.D. Ross, R.L. Scruggs. J.Mol. Biol. 45, 567 (1969)
- 76) W. Brown, J.Chromatog. 59, 335 (1972)
- 77) S. Lapanje, I. Wadsö, Eur. J.Biochem. 22, 345 (1971)
- 78) R. Biltonen, A.T. Schwartz, I. Wadsö. Biochemistry 10, 3417 (1971)
- 79) J.M. Sturtevant, P.A. Lyons, J.Chem. Thermodynamics 1, 251 (1969)
- 80) R. Eriksson, I. Wadsö, Eur. Biophys. Congr. Proc. 4, 319 (1971)
- 81) J.M. Sturtevant, J.Biol.Chem. 247, 968 (1972)
- 82) J.M. Sturtevant, J.A. Gertl, F.H. Westheimer, J. Amer. Chem. Soc. 95, 8168 (1973)
- 84) R.C. Phillips, P. Eisenberg, P.George, R.J.Rutman, J. Biol.Chem.240, 4393 (1965)
- 83) R.C. Phillips, P.P.George, R.J. Rutman. Biochemistry 2, 501 (1963)
- 85) R.A.Alberty, R.M. Smith, R.M. Bock, J. Biol.Chem. 193, 425 (1951)
- 86) S.P. Datta, A.K. Grzybowski, B.A. Weston. J.Chem.Soc. 1963, 792
- 87) I. Grenthe, H. Ots, O. Ginstrop. Acta Chem. Scand. 24, 1067 (1970)
- 88) R.G. Bates, H.B.Hetzer, J.Phys.Chem. 65, 667 (1961)
- 89) G. Ojelund, I. Wadsö, Acta Chem.Scand. 22, 2691 (1968)
- 90) Y. Naito. Physiol. Chem. Phys. 4, 27 (1972)
- 91) H.I. Hardonk, P.J. Hoedermaker, Acta Histochem. Suppl. 10, 385 (1971)

- 92) M. Harada, T. Iwasa, H. Sugimoto, T. Yokotsuka, Nippon Shokuhin Kogyo Gakkai 15, 316 (1968)
- 93) E.C. Herman, B.E. Wright. J.Biol.Chem. 234, 122 (1958)
- 94) E. Shukowski, W. Bjork, M. Caskowski, J.Biol.Chem. 236, 2477 (1963)
- 95) H. Kluge, W. Hartmann, V.Wieczorek, W. Zahlten. J.Neurochem. 19, 1409 (1972)
- 96) K.J. Pitzer. J.Amer. Chem.Soc. 59, 2365 (1937)
- 97) A.K. Grzybowski. J. Phys. Chem. 62, 555 (1958)
- 98) Bjerrum, Schwarzenbach, Sillen. Stability Constants of Metal - Ion Complexes. Part II. Inorganic Ligands, Chemical Society, London (1957)
- 99) R.G. Bates, S.F. Acree. J. Research Natl. Bur. Standards 30, 129 (1943)
- 100) L.F. Nims, J. Amer. Chem. Soc. 55, 1946 (1933)
- 101) L. Shuster, N.O. Kaplan, J.Biol.Chem. 201, 535 (1953)
- 102) G.Michal, M. Nelböck, G.Weimann. Z.Anal.Chem. 252, 189 (1970)
- 103) P. George, R.J. Witonsky, M. Trachtman, C.Wu, W. Dorwart, L. Richman, W.Richman, F. Shurayh, B. Lentz, Biochim. Biophys. Acta 223, 1 (1970)
- 104) A. Gabbai, I. Marcus, J.G. Falbriard, T. Posternak. Helv.Chim. Acta 54, 2133 (1971)
- 105) W.J. Thompson, M.M. Appleman. J.Biol.Chem. 246, 3145 (1971)
- 106) J. Kurashina, K. Takai, C. Suzuki-Hori, H. Okamoto, O. Hayaishi, J. Biol. Chem. 249, 4824 (1974)

